



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA: EFECTOS DEL  
SILENCIAMIENTO MIOCÁRDICO IN VIVO DEL  
INTERCAMBIADOR  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1)**

---

**Tesista: Lic. Andrés J. Medina**

**Directora: Dra. Irene L. Ennis**

**Año: 2019**

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) Dr. Horacio E. Cingolani, de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Irene L. Ennis

## Resumen

Frente a situaciones de sobrecarga hemodinámica (de presión o de volumen) el corazón responde aumentando su masa fundamentalmente a expensas del crecimiento de los miocitos, condición conocida como hipertrofia cardíaca (HC). Sin embargo, el corazón está compuesto varios tipos celulares tales como cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de musculo liso vascular y una matriz extracelular. Si bien los cardiomiocitos constituyen sólo un tercio del número total de células, representan entre el 70-80 % de la masa cardíaca y el crecimiento postnatal del corazón ocurre principalmente por el aumento del tamaño de estas células musculares estriadas. La HC puede ser una adaptación favorable frente a un aumento del trabajo cardíaco (HC fisiológica), como ocurre en individuos sanos que realizan rutinas de entrenamiento físico isotónico o durante el embarazo. Por el contrario, puede representar la antesala de la insuficiencia cardíaca (HC patológica) cuando es desencadenada en el marco de enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión arterial, algunas valvulopatías o el post infarto agudo de miocardio. Más aun, la HC patológica es uno de los principales factores independientes de riesgo cardiovascular asociado habitualmente al desarrollo de arritmias, insuficiencia cardíaca y muerte. En este sentido, es importante recordar que las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, siendo en la República Argentina, según datos del Ministerio de Salud, responsables de alrededor de 100 mil muertes por año. Por lo tanto, resulta imprescindible el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas.

La activación crónica del sistema renina-angiotensina- aldosterona favorece el desarrollo de varias enfermedades cardiacas en las que la HC patológica ocupa un lugar preponderante. En este contexto, la hiperactividad de la isoforma 1 del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1) juega un rol clave.

El objetivo del siguiente trabajo de Tesis Doctoral fue prevenir el desarrollo de HC patológica inducida infusión crónica por angiotensina II (ANGII) mediante el silenciamiento génico del NHE-1 en el miocardio. La inyección intramiocárdica de un

lentivirus portador de una secuencia de ARN de interferencia (ARNi) contra el NHE-1 (l-shNHE1) redujo significativamente la expresión del NHE-1 exclusivamente en corazón.(~ 48 %) y previno el remodelado cardiaco en ratas Wistar expuestas a ANGII (peso biventricular/longitud de la tibia:  $24,03 \pm 0,7915$  mg/mm vs.  $28,45 \pm 0,9779$  mg/mm y % de colágeno  $2,526 \pm 0,5003$  vs.  $5,982 \pm 1,043$ ; l-shNHE1 + ANGII vs ANGII, respectivamente). Interesantemente, estos resultados se acompañaron de una mejora en la función cardíaca evaluada mediante ecocardiografía, a pesar de no generarse cambios en la presión arterial sistémica que permaneció elevada en el grupo inyectado con l-shNHE1 ( $\Delta$  Fracción de acortamiento  $0,5960 \pm 0,4228$  vs.  $-0,9567 \pm 0,06888$  y presión arterial al final del tratamiento con ANGII  $141,2 \pm 6,117$  mm Hg vs.  $134,1 \pm 6,723$  mm Hg; l-shNHE1 + ANGII vs ANGII, respectivamente). Por otra parte, la infusión de ANGII produjo un aumento significativo en la actividad de la enzima NADPH oxidasa, sin ser evitado por la inyección del l-shNHE1; aunque sí evitó el aumento del estrés oxidativo revelado por la normalización de la peroxidación lipídica medida por la técnica de T-BARS ( $12,40 \pm 2,887$  vs.  $23,05 \pm 1,537$ ; l-shNHE1 + ANGII vs. ANGII, respectivamente).

Estos resultados permiten especular sobre la posibilidad de que la inyección intramiocárdica de un lentivirus portador de una secuencia de ARNi contra el NHE-1 pueda convertirse en un futuro no tan lejano, en una herramienta para la prevención de la HC patológica inducida por ANGII. Antes, será necesario evaluar y resolver aspectos de índole ética, sobre la posibilidad de efectos cancerígenos por la inserción en sitios no deseados del genoma viral, la duración del silenciamiento o necesidad de reiteración de la administración, entre los más importantes.



## **Publicaciones y congresos donde se exhibieron resultados del presente trabajo de Tesis**

### **Doctoral**

#### **Publicación**

- Andrés J. Medina, Oscar A. Pinilla, Enrique L. Portiansky, Claudia I. Caldiz, Irene L. Ennis. Silencing of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1(NHE-1) prevents cardiac structural and functional remodeling induced by Angiotensin II. Exp Mol Pathol. 2019 Jan 18;107:1-9. doi: 0.1016/j.yexmp.2019.01.007.

#### **Congresos:**

- Reunión anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 5 al 7 de octubre de 2016. La Plata, Argentina. Prevención de la hipertrofia cardíaca (HC) y el estrés oxidativo inducidos por angiotensina II mediante el silenciamiento miocárdico selectivo del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE-1). Medina AJ, Caldiz CI, Ennis IL. 4TH NATIONAL MEETING OF TEACHERS OF PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS - CONGRESS OF THE ARGENTINEAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY 2016" Special Edition - Volumen 9, 2016. <https://pmr.safisiol.org.ar/archive/vol/9>
- Medina AJ, Pinilla OA, Caldiz CI, Ennis IL. Silenciamiento cardiaco del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-1 (NHE-1): una estrategia para prevenir el remodelado estructural y funcional inducido por angiotensina II (ANGII). XXIV Congreso Argentino de Hipertensión Arterial. 20-22 DE ABRIL 2017. Mendoza.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
Hipertrofia cardíaca	4
Intercambiador sodio/hidrógeno (NHE)	8
Silenciamiento mediado por ARN de interferencia	12
Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)	14
Especies reactivas del oxígeno	17
Hipertrofia cardíaca, NHE-1 y Angiotensina II	19
 <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	 <b>23</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 <b>26</b>
Animales de experimentación	27
Grupos experimentales	27
Sistema de transferencia de genes: lentivirus	27
Partículas lentivirales	30
Purificación de vectores plasmídicos estructurales	30
Cultivo de bacterias E. Coli DH5 $\alpha$ electrocompetentes	30
Transformación de bacterias electrocompetentes	30
Aislamiento de vectores plasmídicos mediante miniprep	31
Aislamiento de vectores plasmídicos a gran escala: maxiprep	32
Producción de partículas lentivirales	33
Cultivo celular	33
Construcción de los lentivirus	33

Inyección de genes lentivirales	36
Inducción de hipertrofia cardíaca patológica por administración de ANGII	36
Determinación del área de los cardiomiocitos y de colágeno	37
Especies reactivas del oxígeno	37
Medición de la producción de anión superóxido	38
Peroxidación lipídica	38
Actividad de NADPH oxidasa	38
Ecocardiografía	39
Determinación de presión arterial	40
Medición de pH intracelular	40
Análisis de expresión de proteínas	42
Determinación de concentración de proteínas	43
Determinación de expresión de NHE-1, GAPDH	43
Expresión de ARNm por RT-qPCR	45
Análisis estadístico	49
<b>RESULTADOS</b>	50
Producción de partículas lentivirales	51
Evaluación de la eficiencia de silenciamiento del lentivirus	51
Silenciamiento del NHE-1 en un modelo <i>in vivo</i>	55
Efecto del silenciamiento del NHE-1 sobre la presión arterial sistólica	58
Evaluación de parámetros hipertróficos y ecocardiográficos	59
Expresión de BNP y análisis histológicos	61
Evaluación del estrés oxidativo	63

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>73</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**Ago2:** Argonauta 2

**Akt: PKB:** Proteína quinasa B

**ANGII:** Angiotensina II

**ANGI:** Angiotensina I

**BNP:** péptido natriurético cerebral

**CaM:** Calcio/Calmodulina

**CaMKII:** Calcio/Calmodulina proteína quinasa II

**CaN:** Calcineurina

**CMV:** Citomegalovirus

**Cpm:** Cuentas por minuto

**DAG:** Diacilglicerol

**DDVI:** Diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo

**DSVI:** Diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo

**DTT:** 1,4-ditiotreitol

**ECA:** Enzima convertidora de angiotensina

**EGF:** Factor de crecimiento endotelial

**ET-1:** Endotelina 1

**HC:** Hipertrofia Cardiaca

**HDAC:** Histonas desacetilasa

**HEK:** células embrionaria de riñón humano

**HIV:** Virus de inmunodeficiencia humana

**IP<sub>3</sub>:** Inositol 1,4,5-trifosfato

**NCX:** Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

**NE:** Norepinefrina

**NHE:** Intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

**NOX:** NADPH oxidasa

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato

**PKC:** Proteína quinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PPD:** espesor en diástole de la pared posterior del ventrículo izquierdo

**PPS:** espesor sistólico de la pared posterior del ventrículo izquierdo

**PPT:** Polipurina

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por ARN (RNA induced silencing complex)

**EROs:** Especies reactivas del oxígeno

**RRE:** Elemento de respuesta a Rev

**SD:** espesor diastólico del tabique interventricular

**SHR:** Ratas espontáneamente hipertensas

**shRNA:** ARN doble cadena con pequeña horquilla

**siRNA:** ARN de interferencia pequeño

**SRAA:** Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**SS:** espesor sistólico del tabique interventricular

**STC:** Sección transversal de los cardiomiocitos

**TBARS:** Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

**TBS:** Buffer Tris salino

**TNF-1:** Factor de necrosis tumoral 1

**VI:** Ventrículo izquierdo

**VSV-G:** Proteína G del virus de la estomatitis vesicular

# INTRODUCCIÓN

### **Hipertrofia cardíaca**

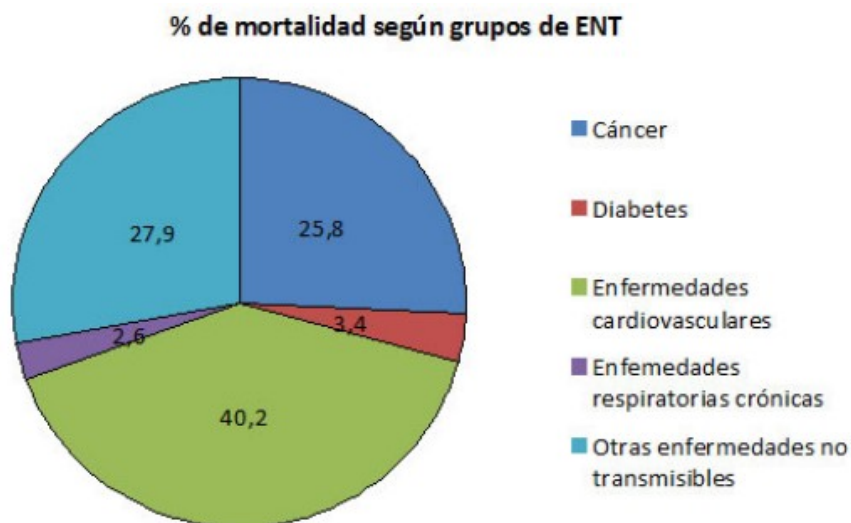
El corazón está compuesto por fibras musculares estriadas (cardiomiocitos) y otros tipos celulares tales como fibroblastos, células endoteliales y células de músculo liso vascular, además de una matriz extracelular. Si bien los cardiomiocitos constituyen sólo un tercio del número total de células, representan entre el 70-80 % de la masa cardíaca[1] y el crecimiento postnatal del corazón ocurre fundamentalmente por el aumento del tamaño de estas células musculares.

Frente a situaciones de sobrecarga hemodinámica (de presión o de volumen) el corazón responde aumentando su masa a expensas principalmente del crecimiento de los miocitos, dando lugar al desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC). La HC puede ser una adaptación favorable frente a un aumento del trabajo cardíaco (HC fisiológica), como ocurre en individuos sanos que realizan rutinas de entrenamiento físico isotónico o durante el embarazo. Por el contrario, puede representar la antesala de la insuficiencia cardíaca (HC patológica) cuando es desencadenada por hipertensión arterial, valvulopatías o post infarto agudo de miocardio, por citar las situaciones más frecuentes. Más aun, la HC patológica es uno de los principales factores independientes de riesgo cardiovascular asociado habitualmente al desarrollo de arritmias, insuficiencia cardíaca y muerte. [2-6] Esto cobra todavía mayor relevancia si recordamos que las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en los países desarrollados. En la República Argentina, según datos del Ministerio de Salud, fallecen alrededor de 100 mil personas por año por esta causa. (**Figura 1**)



Mortalidad en Argentina 2013							
Causa de muerte		Cantidad de muertes	Distribución de muertes (%)	Tasa de mortalidad (por 10.000)	AVPP (por 10.000)*	AVPP (por 10.000)*	Distribución de AVPP (%)
Enfermedades transmisibles,		45.100	13,8	10,7	130,6	140,6	21,5
Enfermedades crónicas no transmisibles		233.882	71,7	55,4	299,7	322,6	49,4
	Cáncer	60.294	18,5	14,3	94,2	101,4	15,5
	Diabetes	8.045	2,5	1,9	8,2	8,9	1,4
	Enfermedades cardiovasculares	94.099	28,9	22,3	70,2	75,5	11,6
	Enfermedades respiratorias	6.175	8,6	1,5	4,4	4,8	0,7
	Otras enfermedades no	65.269	13,3	15,5	122,7	132,0	20,2
Lesiones		21.171	6,5	5,0	143,7	154,7	23,7
Mal definidas		26.044	8,0	6,2	32,6	35,1	5,4
Total		326.197	100,0	77,3	606,6	652,9	100,0
*Hasta 70 años							

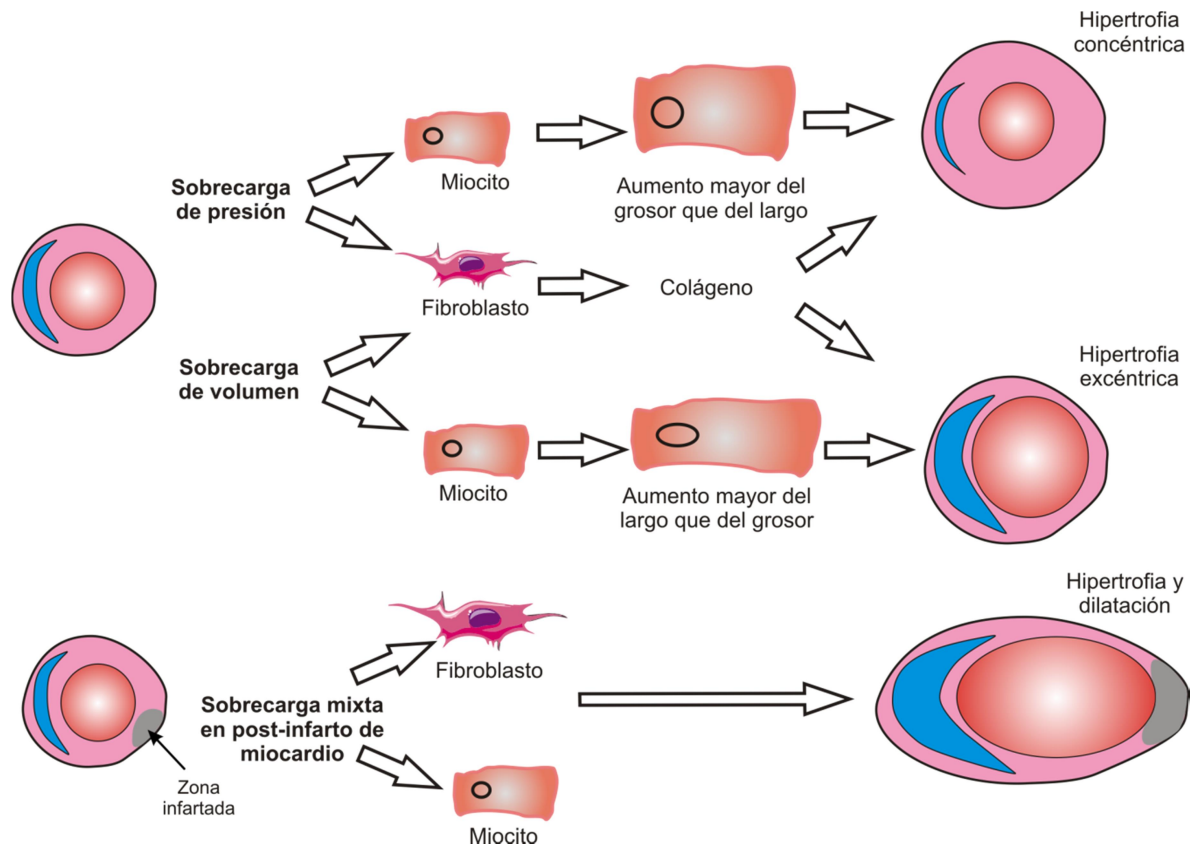
Fuente: Elaboración propia en base a datos de la Dirección de Estadísticas e Información en Salud (2013) y la Proyección Poblacional 2013 según Censo 2010 del Instituto Nacional de Estadística y Censos



**Figura 1.** Datos del ministerio de salud sobre mortalidad en Argentina hasta el año 2013. Porcentaje de mortalidad según grupos de enfermedades no transmisibles. Dirección de Estadísticas e Información en Salud (2013) <http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/vigilancia/areas-de-vigilancia/mortalidad>

Tal como dijimos, el aumento del tamaño del corazón durante la HC se debe principalmente al crecimiento de los miocitos y no a un mayor número de estos dado que son células altamente diferenciadas en detrimento de su capacidad mitótica. El aumento del volumen de los miocitos está determinado por una mayor síntesis proteica que, en el caso de la HC patológica, va acompañado de un aumento de la fibrosis y la apoptosis, disminución de la densidad vascular y reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto [7-12]. Esta reprogramación incluye a los genes de los péptidos natriuréticos atrial y cerebral (BNP), así como las isoformas fetales de las proteínas contráctiles [13-15].

El corazón modifica su geometría en respuesta a los requerimientos hemodinámicos y el tipo de sobrecarga determina el patrón de HC. La sobrecarga de presión típicamente produce un aumento del espesor de la pared ventricular, con poco o ningún grado de dilatación de la cavidad. La adición de los sarcómeros ocurre en paralelo originando una hipertrofia de tipo concéntrico. La sobrecarga de volumen en cambio, está caracterizada por un incremento modesto en el espesor de la pared ventricular y un gran aumento en el volumen de la cavidad, debido a la adición en serie de nuevos sarcómeros. Este tipo de hipertrofia es llamada hipertrofia excéntrica. En algunas circunstancias tales como el post infarto de miocardio la situación es más compleja y se produce una combinación de sobrecarga de volumen y de presión que desencadenan tanto aumento del espesor de las paredes ventriculares como dilatación (**Figura 2**) [16, 17].



**Figura 2** Se esquematizan los tres patrones de geometría principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que la origina. En la sobrecarga de presión el tamaño de los miocitos aumenta predominantemente el grosor de las paredes ventriculares, dando lugar a la HC concéntrica. Se observa en un esquema del corte transversal del ventrículo izquierdo, que el crecimiento de la pared es predominantemente hacia el centro de la cavidad. En la sobrecarga de volumen el tamaño de los miocitos aumenta predominantemente en largo, originando la HC excéntrica. En el post infarto de miocardio existe sobrecarga de presión y de volumen sobre las zonas no infartadas y el resultado es una combinación de HC concéntrica y excéntrica. El aumento de la fibrosis, como resultado de una mayor síntesis de colágeno por los fibroblastos, está presente en los tres patrones de HC.

### **Intercambiador sodio/hidrógeno (NHE)**

El NHE es una proteína que se expresa de manera ubicua en prácticamente la totalidad de los tipos celulares de mamíferos. Participa en la regulación del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ), del volumen, diferenciación, migración y proliferación celular. Además está involucrado en la organización del citoesqueleto y la apoptosis en diferentes tipos celulares. El NHE produce el intercambio electroneutro de un protón ( $\text{H}^+$ ) intracelular por un ion sodio ( $\text{Na}^+$ ) del espacio extracelular. Actualmente se conocen nueve isoformas de esta proteína (NHE1-NHE9) (**Tabla 1**), la expresión de estas depende del tejido, tipo celular y función fisiológica.

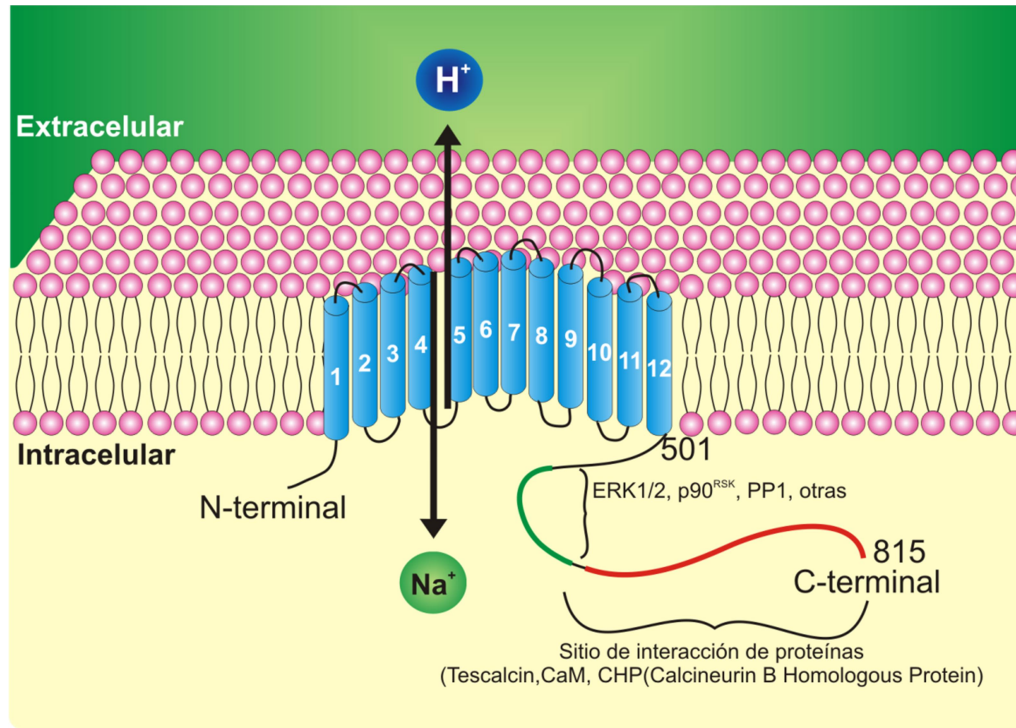
La isoforma 1 del intercambiador es la más abundante en el miocardio, existe como homodímero en la membrana plasmática y posee 12 segmentos transmembrana. Si bien su estructura no está todavía bien determinada, hay varios modelos propuestos, donde se sugieren diferentes sitios de glicosilación [18-20]. Asimismo se ha propuesto que en el extremo N-terminal se encontraría una secuencia señal con sitio de corte en las inmediaciones de donde comienza el primer segmento transmembrana (TM1) [19]. Además de los modelos propuestos por Wakabayashi y Landau, se han presentado otros modelos tridimensionales del NHE-1 [20, 21]. Uno de los cuales sugiere que TM5 y TM11 están involucrados en el intercambio iónico y unión a inhibidores farmacológicos [20].

Isoforma	Localización	Caracterización
NHE-1	Todas las células. Isoforma predominante en el corazón	Mayor sensibilidad al amiloride y al cariporide (HOE642)
NHE-2	Tracto gastrointestinal y riñón	Membrana apical de epitelios
NHE-3	Tracto gastrointestinal y riñón	Membrana apical de epitelios
NHE-4	Riñón	Membrana basolateral de epitelios
NHE-5	Cerebro	
NHE-6	Todo tipo de células	Intracelular. Membrana mitocondrial, endosomas recién reciclados
NHE-7	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi distal
NHE-8	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi medio a distal
NHE-9	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi medio a distal

**Tabla 1.** Caracterización y distribución de las distintas isoformas descriptas del NHE

Por otro lado, se ha encontrado que el NHE-1 cumple un rol clave durante el desarrollo en mamíferos ya que ratones a los cuales se les ha deletado el NHE-1 poseen un crecimiento postnatal disminuido, ataxia, convulsiones epilépticas y aumento de la mortalidad [22].

La isoforma 1 del NHE se expresa predominantemente en los discos intercalares y túbulos transversales de los cardiomiocitos [23, 24]. Está compuesto por 815 aminoácidos separados en dos dominios principales, el N-terminal que es el segmento transmembrana y el dominio C-terminal citosólico. El primero es el responsable del transporte de los iones además de ser el lugar que contiene un sensor alostérico para los  $H^+$  que le confiere sensibilidad a la concentración de  $H^+$  intracelular. En tanto, el dominio C-terminal está constituido por regiones que pueden sufrir modificaciones postraduccionales que regulan la actividad del intercambiador.



**Figura 3. Esquema de la estructura propuesta del NHE-1.** NHE-1 consiste en dos dominios principales, uno de 12 segmentos transmembrana donde tiene lugar el intercambio iónico y el otro citoplasmático donde se encuentran los sitios de regulación. El dominio citoplasmático es fosforilado por varias quinasas e interacciona con proteínas que regulan su actividad. Entre las proteínas regulatorias de importancia en el miocardio se encuentran: las proteínas homologas a calcineurina (CHPs), la anhidrasa carbónica II (CAII), la calmodulina (CaM) para la cual el NHE-1 posee dos sitios de unión, uno de alta afinidad y otro de afinidad intermedia. Por otro lado también lo modulan proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2), la proteína quinasa S6 ribosomal (p90<sup>RSK</sup>), la proteína quinasa B (PKB o AKT), entre otras.

El NHE-1 se activa en respuesta a varios estímulos extracelulares que, generalmente a través de proteínas intermediarias, modifican la cola citoplasmática mediante mecanismos dependientes o independientes de fosforilación. Entre las proteínas que interactúan con el dominio citosólico se encuentran proteínas de unión a  $Ca^{2+}$ , quinasas, fosfatasas y proteínas del citoesqueleto [19, 24-32]. Además, está demostrado que la quinasa p90<sup>RSK</sup> fosforila al NHE-1 en el residuo serina 703 [33], la proteína quinasa B o Akt en la serina 648 [34, 35] y en otros sitios del dominio regulatorio [36, 37]. Por otro lado, se ha encontrado que p90<sup>RSK</sup> también es capaz de fosforilar otros sitios del extremo C-terminal, como serina 770 y 771 en cultivos de miocitos cardíacos de

ratas neonatas [38, 39]. Las fosforilaciones e interacciones con proteínas hacen que el dominio regulatorio del intercambiador pueda adoptar diferentes conformaciones que afectan la actividad del mismo.

Durante el desarrollo de la HC patológica el NHE-1 se encuentra hiperactivo [40]. Esta hiperactividad se debería al aumento en su estado de fosforilación [41] en el dominio regulatorio, más específicamente en la serina 703 debido a la activación de la quinasa p90<sup>RSK</sup> [42-44] y en las serinas 770 y 771 en miocitos cardiacos de ratas neonatas sometidos a acidosis sostenida [38, 39]. Se ha demostrado que al inhibir el NHE-1 con cariporide, que es un inhibidor farmacológico específico del intercambiador, se revierte la HC en ratas espontáneamente hipertensas [45] y la fosforilación en serina 703 por p90<sup>RSK</sup> [46].

### **Silenciamiento mediado por ARN de interferencia**

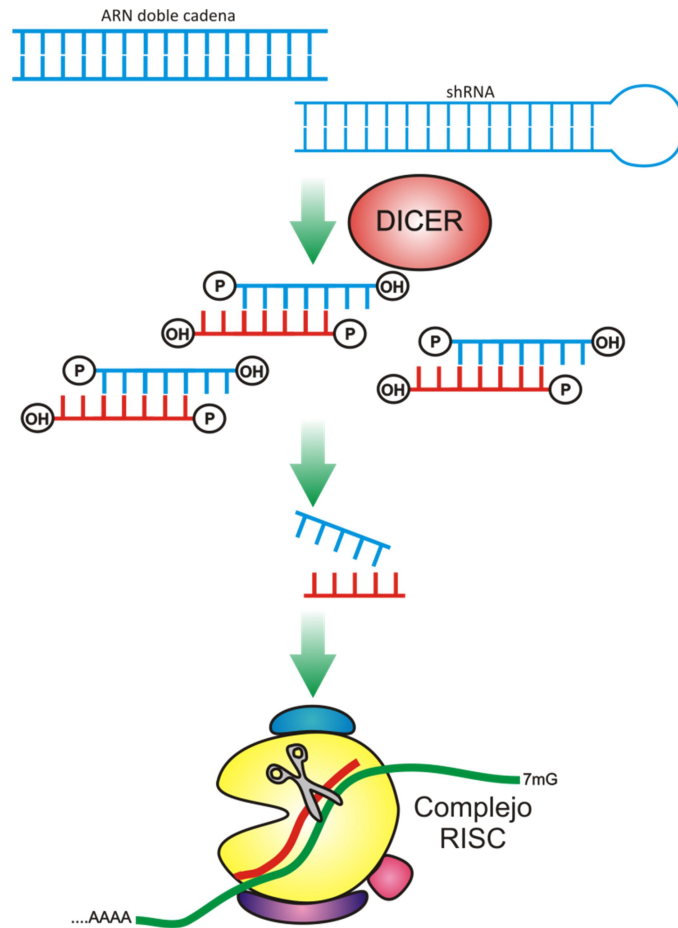
Los ARN de interferencia (ARNi) son pequeñas moléculas de ácido nucleico, constituidas por alrededor de 20-30 nucleótidos que al unirse a secuencias complementarias de ARNm pueden inducir su degradación. Desde su descubrimiento, primero en plantas y luego en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [47, 48], se han comenzado a utilizar con más frecuencia como herramienta de silenciamiento génico en biología molecular.

Dentro de los diferentes tipos de ARNi que se conocen, pueden encontrarse los siRNA (small interference RNA) y shRNA (small hairpin RNA), entre otros. Los siRNAs son pequeñas moléculas de ARN doble cadena de 20-21 nucleótidos de longitud. Por otro lado, los shRNA poseen estructura de simple cadena que en su secuencia presentan regiones complementarias que le permite adoptar conformación de horquilla.

Tanto los siRNA como los shRNA son comúnmente usados para silenciamiento de ARNm, pero presentan algunas diferencias en sus mecanismos de acción. En general, el procesamiento de los ARNi involucra el clivaje de largas cadenas de ARN o de los shRNA para generar pequeños fragmentos ARN. Estos fragmentos generalmente contienen dos nucleótidos que sobresalen en el extremo 3' de cada cadena. El procesamiento de estas cadenas de ARN es llevado a cabo por una enzima llamada Dicer que posee actividad similar a la RNasa III. Esta endoribonucleasa corta la cadena de ARNi en pequeños fragmentos. Una vez formados, los siRNAs interaccionan con un complejo multiproteico denominado RISC (RNA induced silencing complex). Al unirse a RISC, las cadenas de los siRNAs se separan y la que posee mayor estabilidad en su extremo 5' es integrada al complejo RISC activo. La cadena simple antisentido del siRNA guía y alinea al complejo RISC con el ARNm blanco y a través de la acción de la proteína Argonauta 2 (Ago2), que forma parte del complejo RISC, el ARNm es clivado y degradado.



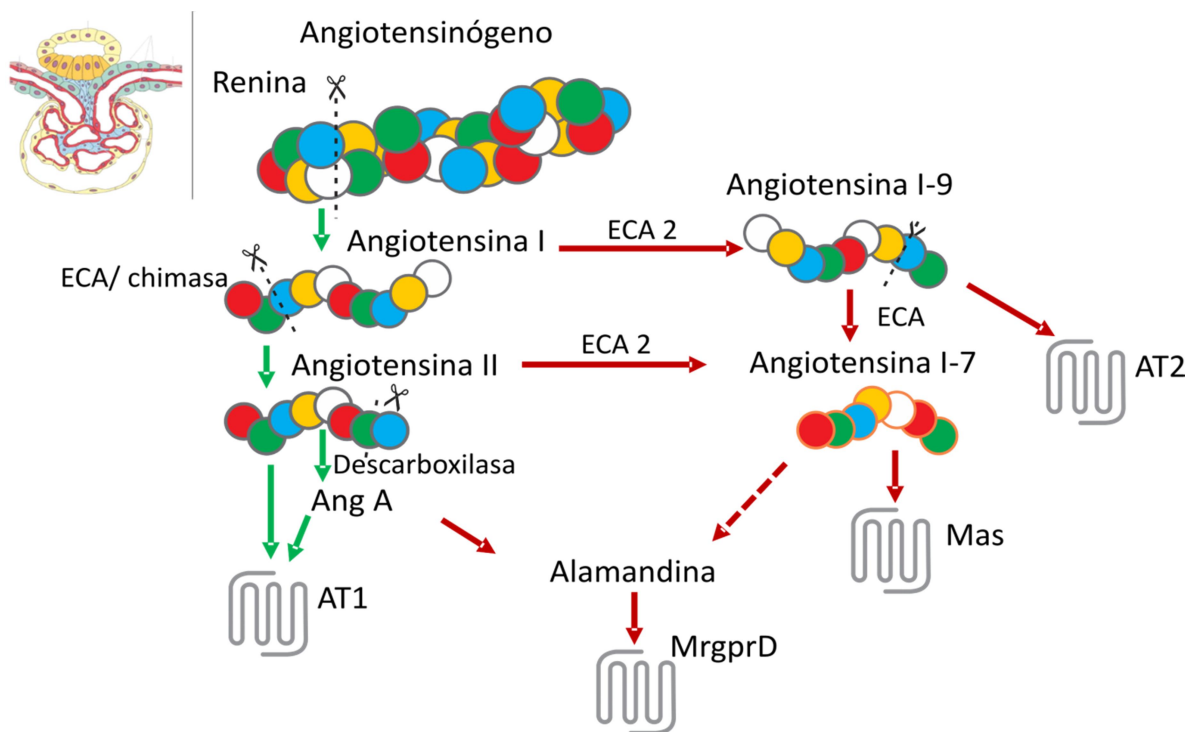
## Introducción



**Figura 4.** Mecanismo de procesamiento de los ARNi. Los ARN de cadena larga o los shRNA son los precursores de los ARNi. Estos son procesados por la enzima Dicer que posee actividad RNasa. Los pequeños fragmentos de ARNi generados se acoplan al complejo proteico RISC que cataliza el clivado de los ARNm blanco. (Adaptado de Hannon GJ et al, *Nature* 2004)

**Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)**

El SRAA está involucrado en diferentes funciones fisiológicas entre las que se encuentran la regulación del tono vascular, volumen minuto cardíaco, volumen de líquidos corporales, crecimiento celular, entre otros. Los péptidos derivados de un precursor común, el angiotensinógeno, se originan inicialmente por la síntesis de pro-renina, precursor de la renina, principalmente en el aparato yuxtaglomerular renal aunque también posiblemente en algunos tejidos extrarrenales. Tras unirse a su receptor, la pro-renina experimenta una activación no proteolítica que consiste en la escisión del propéptido generando renina activa que es secretada a la circulación. La renina posee capacidad catalítica para clivar el angiotensinógeno dando como producto un decapeptido denominado angiotensina I (ANGI). Este a su vez es luego procesado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para generar el octapéptido angiotensina II (ANGII) [AspArg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe].



**Figura 5. Esquema de síntesis de angiotensina II.** El angiotensinógeno es clivado por la renina generada en el aparato yuxtaglomerular en riñón. El producto de esta reacción, la angiotensina I, luego es cortado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para dar angiotensina II. Una vez sintetizada la ANGII es capaz de unirse a su receptor AT1 y de esta manera desencadenar las vías de señalización en la cual está involucrada. Tanto ANGI como ANGII pueden ser sustratos de ECA2 para generar ANG(1-7), a partir de la cual se sintetiza alamandina.

Además de ser un péptido vasoactivo con gran relevancia en el control de la presión arterial, la ANGII regula muchos aspectos de la función celular en diferentes tejidos que no están relacionados con la vasoconstricción. Por otro lado, el SRAA participa en el desarrollo de varias enfermedades, entre ellas, y de forma significativa, en la hipertensión arterial y la HC inducida por sobrecarga hemodinámica.

La ANGII ejerce su efecto a partir de la unión a receptores específicos del tipo “siete dominios transmembrana acoplados a proteína G” (AT1 y AT2). El receptor AT1 es de distribución ubicua pudiéndose encontrar en varios tipos de tejidos, incluyendo músculo liso vascular, endotelio, corazón, cerebro, riñón, glándulas adrenales y tejido adiposo. La unión de la ANGII a este receptor desencadena la activación de la proteína Gq.

A pesar de que ANGII es el principal péptido biológicamente activo del SRAA, en los últimos años varios estudios han revelado la existencia de otros péptidos, enzimas y receptores de funciones múltiples que hacen más complejo al sistema. Entre estos se encuentra la ECA2, la angiotensina-(1-7) [ANG-(1-7)] y el receptor Mas. Este nuevo eje ECA2/ANG-(1-7)/Mas posee la función de equilibrar varias acciones del eje ECA/ANGII/AT1. Este novedoso eje regulador posee como molécula central a la ANG(1-7), un heptapéptido que proviene de la hidrólisis de ANGII producida por la ECA2 u otras peptidasas como la prolil-endopeptidasa (PEP). Este péptido también puede sintetizarse por otra ruta mediante el clivaje de ANGI por enzimas como la endopeptidasa neutral (NEP) y PEP o a través de ECA2 que primero produce ANG(1-9) y luego es procesada por la ECA para dar ANG(1-7) [49]. El efecto de ANG(1-7) es mediado a través de su interacción con los receptores Mas, que forman parte de la familia de receptores acoplados a proteína G. Por otro lado, también se han encontrado otras moléculas que forman parte del SRAA, como es la angiotensina A (ANG-A), la cual tiene afinidad por los receptores AT1 y AT2 de humano, al igual que la ANGII [50, 51]. A su vez, la ANG-A puede ser clivada por la ECA2 para formar otro péptido, la alamandina, que también puede generarse por la descarboxilación de la ANG(1-7). Se ha encontrado que la alamandina posee afinidad por los receptores relacionados a Mas acoplados a proteína G (MrgprD)[52] (**Figura 5**). Estudios recientes han demostrado que la alamandina ejerce un efecto protector sobre el sistema cardiovascular en diferentes modelos experimentales [53-55].

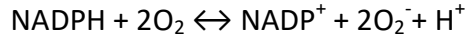
### **Especies reactivas del oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son especies químicas capaces de reaccionar rápidamente con otras moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Varias de ellas poseen electrones desapareados como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot-}$ ) y por ello son considerados radicales libres. Otras como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) y el ácido hipoclorhídrico ( $HOCl$ ) no son radicales libres pero tienen una gran capacidad oxidante que causa estrés oxidativo.

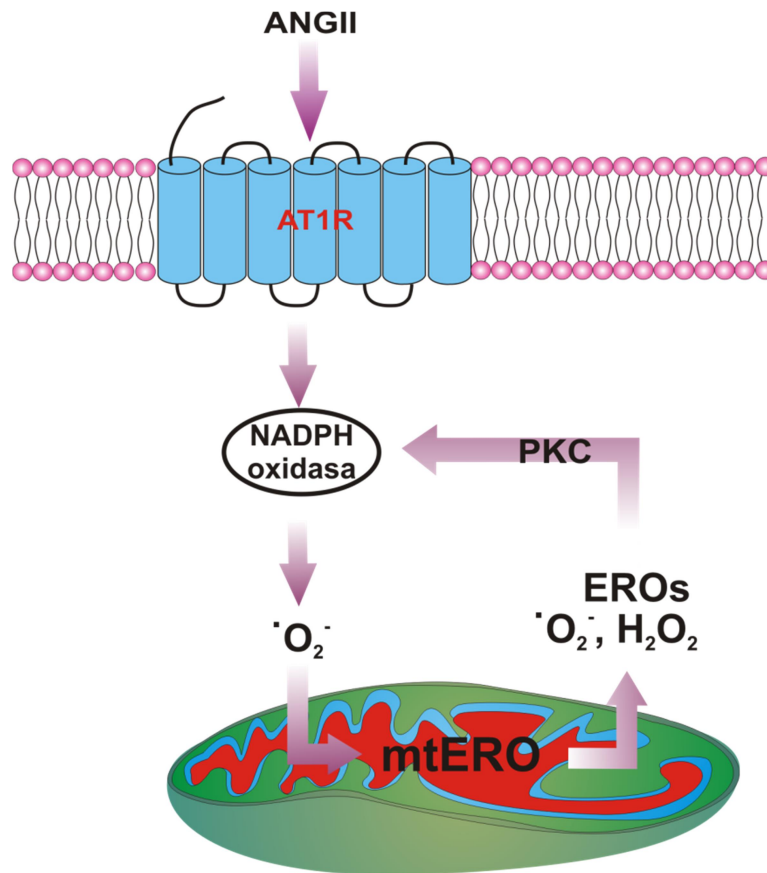
En condiciones fisiológicas, las EROs están implicadas en varias vías de señalización. Cuando hay un desbalance entre la producción y la degradación de estas especies, es decir, entre los mecanismos de defensa antioxidante y la generación de EROs se induce estrés oxidativo y como consecuencia modificaciones en macromoléculas que alteran su actividad. Las EROs que más daño causan en el cuerpo humano son  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot-}$  y  $ONOO^{\cdot-}$ . Tanto la activación del sistema nervioso simpático como del SRAA está asociada con un aumento en la producción de EROs en el tejido cardíaco. El aumento en la producción de EROs cuando es excesivo y no puede ser compensado por los mecanismos antioxidantes celulares conduce a una situación de estrés oxidativo donde se produce oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y daño en el ADN contribuyendo a la disfunción celular.

Actualmente disponemos de evidencia abundante que indica que tanto la disfunción cardíaca sistólica y diastólica, así como la disfunción vascular endotelial son, en parte, consecuencias del aumento del estrés oxidativo. Durante la HC inducida en cultivo de miocitos cardíacos en presencia de ANGII, endotelina-1 y factor de necrosis tumoral 1 (TNF-1), se demostró que las EROs juegan un papel importante [56-58].

La familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX), son proteínas que forman complejos enzimáticos en la membrana celular. Estas enzimas catalizan la producción de radicales libres superóxido mediante la transferencia de un electrón cedido por NADH al oxígeno. Durante este proceso el radical es transportado desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula en intercambio con un protón.



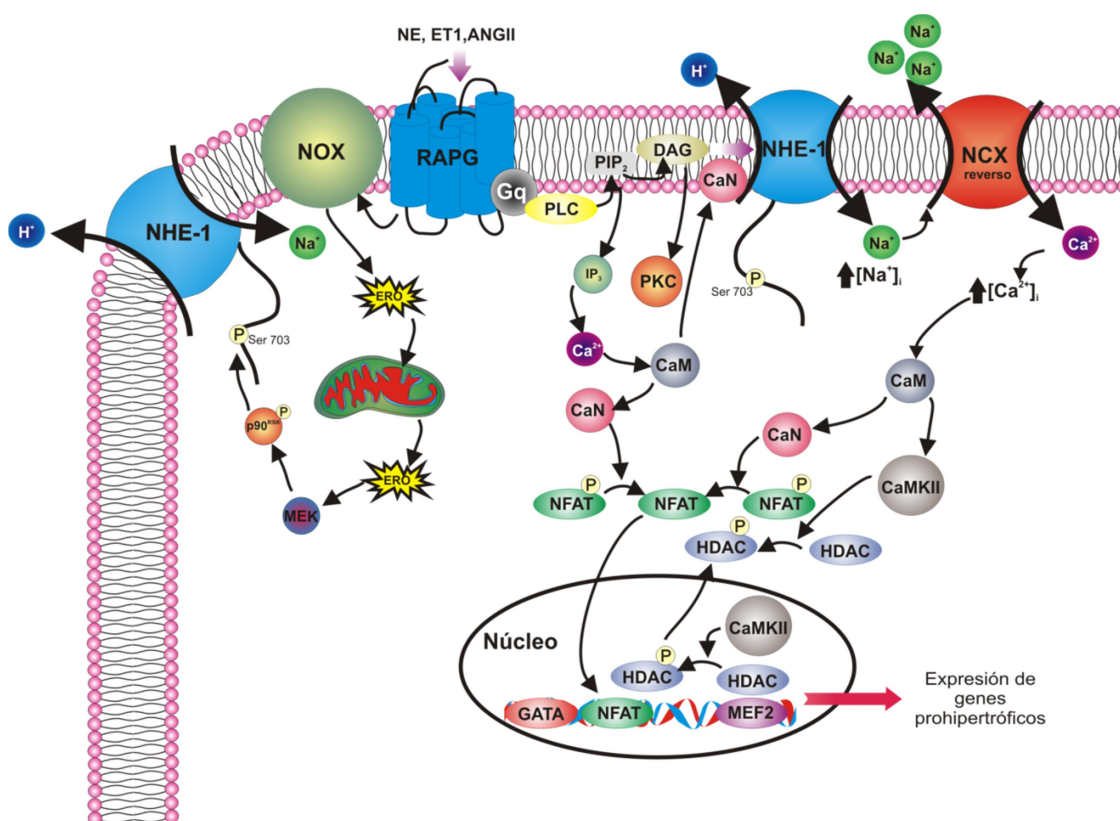
Estas enzimas están involucradas en la inducción de HC por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos [56]. Además, ha sido demostrado que la actividad de las NOX está aumentada en la HC inducida por sobrecarga de presión, lo que va acompañado de una sobre expresión de la isoforma 2 de la NOX tanto en cardiomiocitos como en células endoteliales [59].



**Figura 6.** Esquema del mecanismo propuesto de producción de EROs inducido por ANGII. ANGII se une a su receptor AT1 y esto estimula la activación de la NADPH oxidasa que produce el ion superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos EROs actúan sobre la mitocondria, estimulando la producción de EROs mitocondriales (mtERO). Estos escapan de la mitocondria por el aumento de la permeabilidad mitocondrial a través de poros y canales. En el citosol los mtERO pueden activar a la NADPH oxidasa a través de quinasas redox-sensibles como puede ser PKC u otras tirosina quinasas. Esta vía de producción de EROs también sucede en el proceso de envejecimiento, desregulación del balance iónico o en respuesta a daño por isquemia/reperfusión.

### **Hipertrofia cardíaca, NHE-1 y angiotensina II**

Ha sido ampliamente demostrado en trabajos de nuestro laboratorio así como por otros investigadores que la hiperactividad del NHE-1 miocárdico desempeña un papel crítico en la fisiopatología de la HC patológica [40]. La sobrecarga hemodinámica a la que se expone el corazón determina el estiramiento del miocardio que a través de un mecanismo autocrino/paracrino conduce a la fosforilación e hiperactivación del NHE-1 [60]. La hiperactividad del NHE-1 provoca una sobrecarga de  $\text{Na}^+$  intracelular que favorece el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que actúa en forma reversa [40, 61]. El aumento sostenido de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa vías prohipertróficas, en particular la de la fosfatasa calcineurina, responsables del aumento de la actividad transcripcional y del desarrollo de HC patológica. Se dispone de evidencias que sugieren que la activación de factores de transcripción prohipertróficos, entre los que se encuentran MEF2, NFAT, GATA4 y las histonas desacetilasas de clase II (HDACs) juega un papel esencial en el desarrollo de HC patológica.



**Figura 7. Vías de señalización relacionadas con la activación del NHE-1 durante el desarrollo de HC patológica.**

La activación de receptores acoplados a proteína Gq por los agonistas norepinefrina (NE), endotelina-1 (ET1) y ANGII, inducen la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) por la fosfolipasa C (PLC), produciéndose dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). DAG es un activador de la proteína quinasa C (PKC) e  $\text{IP}_3$  se une a sus receptores produciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual activa a la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM) que puede activar al NHE-1 por interacción directa. El DAG también se ha sugerido como activador directo del NHE-1, mediante interacción con el dominio lipídico del intercambiador. A su vez el NHE-1 puede ser activado por fosforilación en residuo serina 703 por la vía de las MAP quinasas activadas por EROs (vía de ANGII). La activación del NHE-1 lleva a una hiperactividad del mismo. Como consecuencia de esto hay aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular y del  $\text{pH}_i$ . Este aumento de  $\text{Na}^+$  activa al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que actúa en forma reversa, es decir, expulsa tres iones  $\text{Na}^+$  por un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{IP}_3$  como la entrada por NCX generan un incremento en la concentración intracelular que es capaz de activar a CaM que actúa sobre la fosfatasa calcineurina (CaN) la cual defosforila al factor nuclear de células T activadas (NFAT). Este último se une al factor de transcripción GATA4 para así activar la transcripción de genes prohipertrofos. Por otro lado, CaM también puede activar a la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) fosforilando a la histona desacetilasa (HDAC), desreprimiendo la actividad de MEF2 y lo que lleva a la activación de la transcripción de genes prohipertróficos.

No sólo ha sido hallado el NHE-1 hiperactivo en el miocardio hipertrófico de gran variedad de patologías cardiovasculares, sino que además su hiperactividad fue



demostrada como suficiente para desencadenar el desarrollo de HC patológica [62]. Resulta aún más interesante que su inhibición farmacológica específica induce la regresión de la HC patológica en numerosos modelos experimentales, aunque la causa de la misma no sea resuelta (por ejemplo: induce la regresión de la HC en ratas espontáneamente hipertensas sin causar un descenso significativo de la presión arterial [63]).

Debido al éxito de la inhibición del NHE-1 mediante fármacos en modelos experimentales, se diseñaron y llevaron a cabo ensayos clínicos con dos de estos fármacos: cariporide y eniporide, a fin de evaluar si los efectos beneficiosos eran extrapolables a los seres humanos. Hasta el momento se han realizado tres ensayos clínicos usando estos inhibidores: el estudio ESCAMI (Evaluation of the Safety and Cardioprotective effects of eniporide in Acute Myocardial Infarction)[64], el GUARDIAN (GUARD During Ischemia Against Necrosis)[65] y el EXPEDITION (sodium–hydrogen Exchange inhibition to Prevent coronary Events in acute cardiac condition)[66]. En los dos últimos mencionados se utilizó cariporide, mientras que en el primero fue eniporide. Lamentablemente, en ninguno de los ensayos clínicos se pudo encontrar beneficios convincentes de la inhibición del NHE-1; es más, la administración de cariporide durante el ensayo clínico EXPEDITION aumentó la probabilidad de eventos cerebrovasculares [65, 66].

Por lo visto a partir de los resultados de los ensayos clínicos, la inhibición farmacológica del NHE-1 no está exenta de efectos inespecíficos y no deseados. Debido a que el NHE-1 posee una distribución ubicua en el organismo, la inhibición farmacológica no se restringe al miocardio exclusivamente, sino que potencialmente afecta a todos los otros tejidos y órganos, pudiendo comprometer el normal funcionamiento de los mismos. En relación con esto, es importante tener en cuenta que el mecanismo por el cual se propuso disminuir la expresión del NHE-1 en el presente trabajo de Tesis es por la técnica de ARN de interferencia (siRNA) portado por un lentivirus de tercera generación que se inyecta en forma intramiocárdica directa, con el objetivo de limitar su efecto exclusivamente al miocardio.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La hipótesis sobre la que se sustenta el presente trabajo de Tesis Doctoral es la siguiente:

El silenciamiento de la expresión del NHE-1 exclusivamente en el miocardio es capaz de prevenir el desarrollo de HC patológica en situaciones de sobrecarga hemodinámica sin provocar otros efectos indeseados, mejorando la función cardíaca y posiblemente la sobrevida de los animales.

## Objetivos

El objetivo general del proyecto fue impedir el desarrollo de HC patológica a través de la administración intramio cardíaca directa de un lentivirus que porta un siRNA específico para el NHE-1 en un modelo de rata con infusión continua de angiotensina II (ANGII)

### Objetivos particulares:

1. Inducir el desarrollo de HC patológica mediante la administración subcutánea continua de ANGII en ratas macho adultas de la cepa Wistar.
2. Diseñar y producir un lentivirus que contenga un siRNA que sea efectivo para disminuir en forma específica la expresión del NHE-1.
3. Demostrar que el silenciamiento del NHE-1 miocárdico previene el desarrollo de HC patológica en el modelo experimental utilizado.
4. Explorar las consecuencias de la administración del siRNA anti NHE-1 sobre las vías de señalización intracelular involucradas en el desarrollo de HC patológica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **1. Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 5 meses de edad (peso corporal 350-500 g) criadas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Los animales se mantuvieron en cajas de acero inoxidable con lecho de viruta esterilizada y tapa tipo tolva para permitir el acceso ilimitado a alimento balanceado y agua de bebida.

Al momento del sacrificio, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso corporal) y diazepam ( $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal). Los corazones fueron extraídos rápidamente y lavados en buffer Ringer burbujeado con carbógeno ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{O}_2$  95%). Luego se procedió a la toma de muestras para la realización de los ensayos previstos.

Composición buffer Ringer (en g/L): NaCl 7.5; glucosa 2;  $\text{NaHCO}_3$  1.7; KCl 0.35;  $\text{MgSO}_4$  0.26;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05

### **1.1. Grupos experimentales**

Para el desarrollo del trabajo se conformaron por selección aleatoria los siguientes grupos experimentales:

- 1) Grupo Control: Ratas con cirugía simulada (Sham)
- 2) Grupo inyectado con l-shNHE1, implantadas con mini-bomba de ANGII
- 3) Grupo inyectado con buffer fosfato (PBS), implantadas con mini-bomba de ANGII

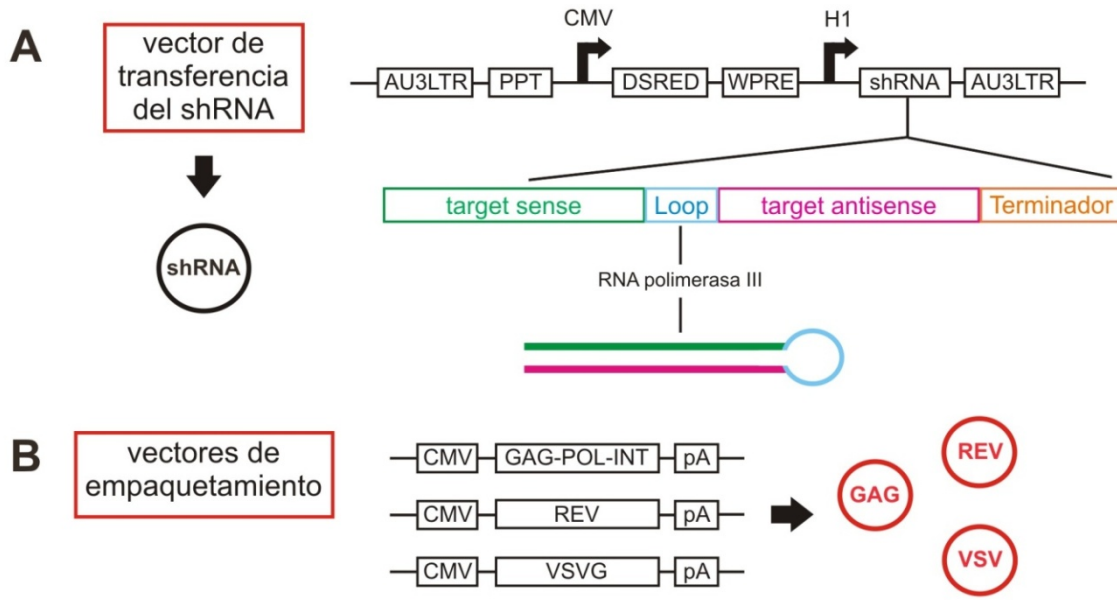
## **2. Sistema de transferencia de genes: lentivirus**

Los vectores lentivirales derivados del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) son capaces de transducir una amplia variedad de células en división y terminales (que ya no se dividen), y se integran de forma estable en el genoma del huésped, permitiendo una expresión prolongada del transgén. El genoma del HIV-1 contiene 9 marcos de lectura abiertos que codifican para al menos 15 proteínas distintas, incluyendo

proteínas estructurales y regulatorias, que están involucradas en el ciclo de infección. La estrategia general usada para producir partículas de vector lentiviral ha sido eliminar del genoma del HIV-1 todos los elementos que no son absolutamente indispensables para la producción de partículas virales, la infección y la integración [67].

Los vectores lentivirales de tercera generación más comúnmente utilizados consisten en 4 plásmidos (**Figura 8**). El vector de transferencia (**Figura 8A**) contiene el transgén de interés, expresado bajo el promotor H1 de la polimerasa III, y el gen codificante de la proteína fluorescente roja DsRed, bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Además porta el elemento WPRE (del inglés *woodchuck hepatitis virus regulatory element*), que sirve para aumentar la expresión del transgén [68], y una región de polipurina (PPT), para incrementar la eficiencia del transporte nuclear del complejo de pre-integración [69].

La secuencia del shRNA contra en NHE-1 está conformada por 5'-GATAGGTTTCCATGTGATC-3' (cadena positiva), seguido por la secuencia 5'-GTTCTTCAAGAGAGAAC-3' (loop), 5'-ATCACATGGAAACCTATC-3' (cadena negativa), y 5'-ATCACATGGAAACCTATC-3' (terminador), en el sitio de corte de BamHI (5') y el de PacI (3'), seguido por el promotor de la ARN polimerasa H1.



**Figura 8. Vectores lentivirales de tercera generación.** **A.** Esquema del vector de transferencia que porta la secuencia del shRNA, además de la proteína fluorescente roja (DsRed). **B.** Vectores de empaquetamiento, que proveen los factores regulatorios y estructurales.

El sistema de empaquetamiento involucra 3 plásmidos adicionales que proveen los factores trans requeridos, llamados Gag-Pol, proteína de envoltura y Rev, respectivamente (**Figura 8B**). Gag-Pol codifica para una integrasa, una transcriptasa reversa, y proteínas estructurales. Las proteínas estructurales son requeridas para la producción de las partículas, mientras que la integrasa y la transcriptasa reversa son empaquetadas dentro de la partícula viral y actúan más adelante en el proceso de infección e integración. Rev interactúa con el elemento de respuesta Rev (RRE), que es una secuencia contenida en el vector de transferencia, que aumenta la exportación del RNA genómico viral del núcleo, favoreciendo el incremento del título viral [67]. Las partículas virales pueden ser tipificadas con una gran variedad de proteínas de envoltura. Una de las más utilizadas es la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la cual es incorporada en la membrana viral y le confiere la habilidad de transducir una gran variedad de tipos celulares [67].



### **3. Partículas lentivirales**

#### **3.1. Purificación de vectores plasmídicos estructurales**

##### **3.1.1. Cultivo de bacterias E. coli DH5- $\alpha$ electrocompetentes**

Bacterias de la cepa E. coli DH5- $\alpha$  fueron usadas para la multiplicación de los plásmidos. Esta cepa bacteriana cuenta con elevada eficiencia para la producción de plásmidos, y además poseen características que las hacen útiles para los métodos que implican la presencia de DNA recombinante: la mutación endA1 inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico; la mutación hsdR17 elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción EcoKI, y por lo tanto los fragmentos de DNA que poseen metilaciones en los sitios EcoKI no son degradados; y la mutación recA elimina la posibilidad de recombinación homóloga.

##### **3.1.2. Transformación de bacterias electrocompetentes.**

La introducción de DNA exógeno a una célula bacteriana es un método conocido como transformación, por la cual se utilizaron los plásmidos mencionados previamente y se introdujeron a las bacterias E. coli DH5- $\alpha$  electrocompetentes. El equipo utilizado para llevar a cabo la transformación fue un Electroporador BioRad, modelo MicropulserTM. Para la introducción del material genético, se realizaron diluciones de los plásmidos y se tomó 1  $\mu$ l para agregarlo a 50  $\mu$ l de bacterias. La mezcla se colocó en cubetas de 0,1 cm de espacio entre electrodos, previamente enfriadas en hielo. Luego se introdujo la cubeta en el equipo y se dio un pulso eléctrico de 1,8 kV. Inmediatamente se resuspendieron las bacterias en 600  $\mu$ l de medio S.O.C. y se transfirieron a un tubo estéril. Se permitió que crezcan a 37 °C con agitación por 1 h, y luego se sembraron 100  $\mu$ l de bacterias transformadas en placas de LB agar suplementadas con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Se incubaron a 37 °C en estufa durante la noche.

Medio Luria-Bertani (LB): Triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l pH 7.0. Al medio sólido se le agrega 10 g/l de agar.

Medio S.O.C.: 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa.

### **3.1.3. Aislamiento de vectores plasmídicos mediante miniprep**

A partir de la técnica de aislamiento de plásmidos a baja escala, Miniprep, se obtuvieron los plásmidos para luego amplificarlos y producirlos en concentraciones necesarias para la producción de las partículas lentivirales. Para ello se utilizó el kit comercial High Purity Plasmid Miniprep Kit (Dong Sheng). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, donde a partir de una colonia de bacterias transformadas se hizo un cultivo de 3 ml en medio LB líquido con 100 µg/ml de ampicilina, y se incubó con agitación durante toda la noche a 37°C. Al otro día se centrifugó el cultivo durante 2 minutos a 8000 rpm, para eliminar el medio de cultivo. El pellet obtenido fue resuspendido en 250 µl de solución de resuspensión con RNasa A, tratando de que no queden grumos. Luego se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inversión hasta que la solución tuvo aspecto viscoso y ligeramente claro. Después se adicionaron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Lo obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm para bajar restos de membrana y ADN cromosómico. El sobrenadante obtenido se colocó dentro de la columna para purificar el plásmido y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Se descartó la solución que quedó en el reservorio de la columna y procedió al lavado de la misma mediante el agregado de 500 µl de solución de lavado (PE) y posterior centrifugación a 1200 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido del reservorio de la columna y se siguió con los lavados pero utilizando 500 µl solución de lavado (W) la cual contiene etanol. Este último lavado se repitió y se volvió a centrifugar para eliminar la solución que pudiera haber quedado en la resina de la columna. Por último, se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml y se agregó 25 µl de buffer TE estéril para eluir el ADN plasmídico, dejándolo incubar durante 2 minutos para luego centrifugar 2 minutos a 12000 rpm. Se corroboró la presencia de plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,4% y se calculó la concentración utilizando el equipo NanoDrop (Thermo Fisher).

El plásmido se guardó a -80°C hasta su uso.

#### **3.1.4 Aislamiento de vectores plasmídicos a gran escala: maxiprep**

Para la obtención de grandes cantidades de los plásmidos estructurales del virus y de los que expresan las secuencias de shNHE-1 y shSCR, se inocularon 250 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) con 150 µl de un cultivo de 18 hs de *E. coli* DH5-α portadora de del plásmido correspondiente, pRRE, pVSV, pREV, pshNHE1 o pshSCR. El cultivo se incubó toda la noche con agitación constante a 37°C. Luego se procedió al aislamiento de los vectores plasmídicos mediante la técnica Maxiprep utilizando el Kit PureLink® HiPure Plasmid DNA Purification (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, el método consistió en: 1) Equilibrar las columnas con buffer de equilibrio 2) Centrifugar el cultivo a 6000 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante. 3) Resuspender el cultivo en 10 ml de buffer de resuspensión con RNasa A. 4) Producir la lisis de las bacterias agregando 10 ml de buffer de lisis, mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. 5) Agregar 10 ml de buffer de precipitación y mezclar por inversión hasta que la solución quede homogénea. Luego centrifugar el lisado a 12000 rpm por 10 min. 6) Colocar el sobrenadante en la columna, donde el ADN plasmídico queda unido a la resina de la misma. 7) Se procedió al lavado de la columna mediante el agregado de 60 ml de buffer de lavado. 8) Agregar 15 ml de buffer de elución y dejar eluir por gravedad. 9) A lo eluido en el paso anterior se lo precipita con isopropanol frío y luego se lo centrifuga a 12000 rpm por 30 min a 4°C. Luego se descarta el sobrenadante, el precipitado se lava con 5 ml de etanol 70% frío y se centrifuga 5 min a 12000 rpm a 4°C. 10) El sobrenadante se descarta y se deja secar el precipitado. Por último se resuspende en 250 µl buffer TE.

Para evaluar la pureza y concentración, los plásmidos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.4% y se cuantificó utilizando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Buffer de resuspensión (R3): 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA RNase A 20 mg/mL

Buffer de lisis (L7): 0.2 M NaOH 1% (w/v) SDS

Buffer de precipitación (N3): 3.1 M Potassium acetate, pH 5.5

Buffer de equilibrio (EQ1): 0.1 M Sodium acetate, pH 5.0 0.6 M NaCl 0.15% (v/v) Triton® X-100

Buffer de lavado (W8): 0.1 M Sodium acetate, pH 5.0 825 mM NaCl

Buffer de elución (E4): 100 mM Tris-HCl, pH 8.5 1.25 M NaCl

Buffer TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 0.1 mM EDTA

### **3.2. Producción de partículas lentivirales**

#### **3.2.1. Cultivo celular**

Células de la línea HEK293T fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (Natocor) 10 % y NaHCO<sub>3</sub> (Biopack), penicilina/estreptomicina (Gibco, ThermoFisher) a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **3.2.2. Construcción de los lentivirus**

Se utilizó un RNA de interferencia contra el NHE-1 (shNHE1) y otro compuesto por los mismos nucleótidos aunque con la secuencia en desorden, denominado shSCR. Se constató previamente que el shSCR no interfiriera con otros ARNm, inclusive con el que codifica para el NHE-1. Estas secuencias se incorporaron a los vectores lentivirales de tercera generación. La utilización de vectores lentivirales ofrece la ventaja de permitir evaluar efectos a largo plazo debido a su integración genómica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los vectores lentivirales además tienen baja inmunogenicidad y han mostrado alta eficiencia de transducción en corazones de roedor.

En el laboratorio ya disponíamos de un RNA que presentaba incluido en una horquilla (small hairpin RNA, shRNA) una secuencia de 19 pares de base (pb) específica

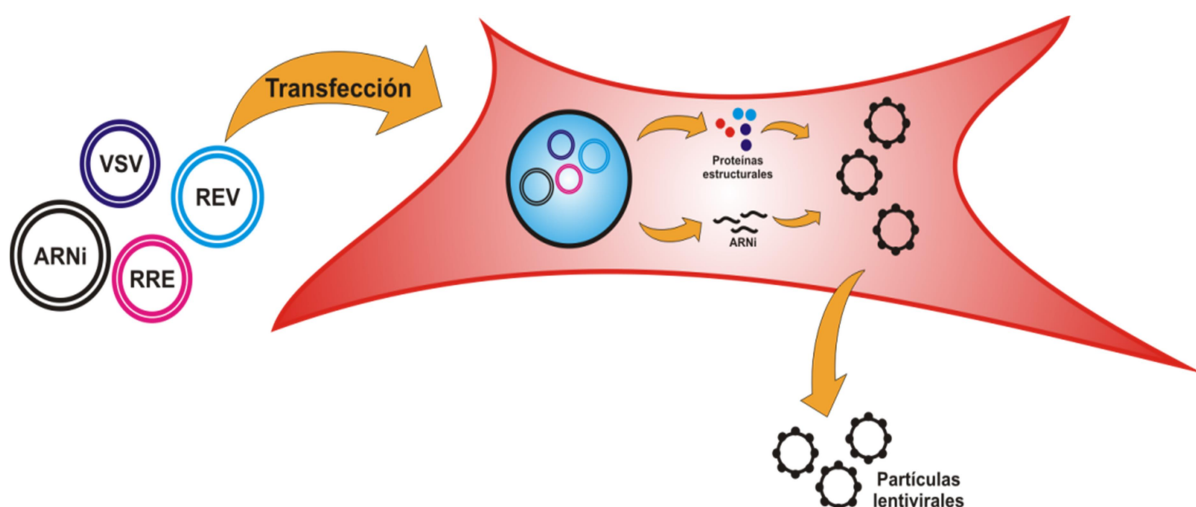
para reducir la expresión del NHE-1 [70]. Como control negativo se produjo un lentivirus con un dúplex de RNA con las mismas bases del shNHE-1 pero mezcladas aleatoriamente (shSCR) de modo que no interfiera con la expresión de ningún gen conocido. Utilizamos un vector lentiviral de tercera generación (PPT.C.DsRed.H1) que tiene el gen indicador de transducción (DsRed) bajo el control del promotor de CMV, y el shNHE-1 bajo el control del promotor H1 de la RNA polimerasa III. La estrategia para la producción de este tipo de virus consiste en separar los distintos elementos virales necesarios para su formación en cuatro plásmidos diferentes. Estos plásmidos son utilizados para transfectar células HEK293T que permiten el correcto ensamblado y la producción del virus. El primer plásmido contiene la información que permite expresar el shRNA bajo el control del promotor de la RNA polimerasa III y el gen reportero DsRed. El segundo plásmido, VSV, contiene la información para las proteínas que cubren la superficie viral; en este caso corresponde a la Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein. Los otros dos vectores descritos como REV y RRE contienen proteínas estructurales y regulatorias que permiten una correcta formación del virus. La transfección de las células 293T con estos plásmidos se realizó por el método de fosfato de calcio[71].

El proceso de transfección implica la introducción de DNA exógeno a una célula eucariota. En el presente trabajo, las partículas virales fueron obtenidas por co-transfección de células HEK 293T con los cuatro plásmidos diferentes. Para la transfección se prepararon los siguientes tubos:

<u>Tubo1</u>	<u>Tubo2</u>
10 µg RRE	590 µl HEPES
5 µg REV	
5 µg VSV-G	
20 µg shNHE-1/pSCR	
72 µl CaCl <sub>2</sub>	
500 µl H <sub>2</sub> O	

Composición Buffer HEPES 2X: 0.274 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro), HEPES (54 mM), H<sub>2</sub>O hasta llegar a volumen final. pH 7.0

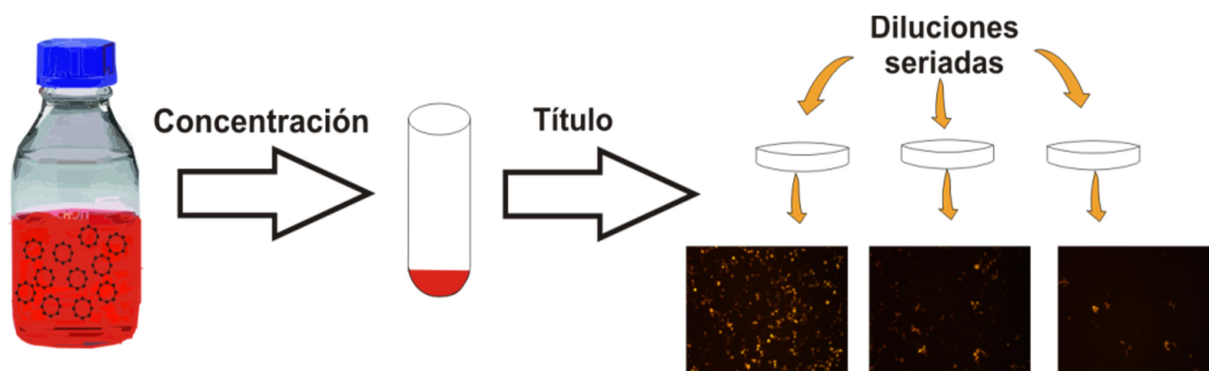
Una vez preparados los 2 tubos, se tomó con pipeta todo el contenido del tubo 1 y se lo agregó al tubo 2, gota a gota para que las soluciones se fueran mezclando bien y se formen pequeñas partículas de fosfato de calcio. Se incubó la mezcla por 20 min a temperatura ambiente, y luego se la transfirió, también gota a gota, al cultivo de HEK293T (aproximadamente 60% de confluencia).



**Figura 9. Producción de partículas lentivirales.** Esquema de transfección por el método de fosfato de calcio de los vectores que expresan proteínas estructurales y el plásmido que codifica para el shNHE-1, en células HEK293T. Los virus formados en el interior celular son liberados al medio de cultivo

A las 48 y 72 hs posteriores se recogió el medio de cultivo, donde se encontraba el lentivirus producido/liberado por las células que fueron co-transfectadas. El medio de cultivo colectado fue centrifugado 20 min a 3000 rpm para bajar células y otros restos que quedaron en suspensión para luego purificar el virus y concentrarlo por ultracentrifugación (1 hora 30 minutos a 30000 rpm). La cuantificación de los viriones infectivos se hizo sobre células HEK293T. Para ello las células fueron infectadas con diluciones seriadas del lentivirus en presencia de 10 µg/ml de polybrene (Sigma) y pasadas

48 hs post infección se observó por microscopia de fluorescencia expresión de la proteína roja en las células infectadas.

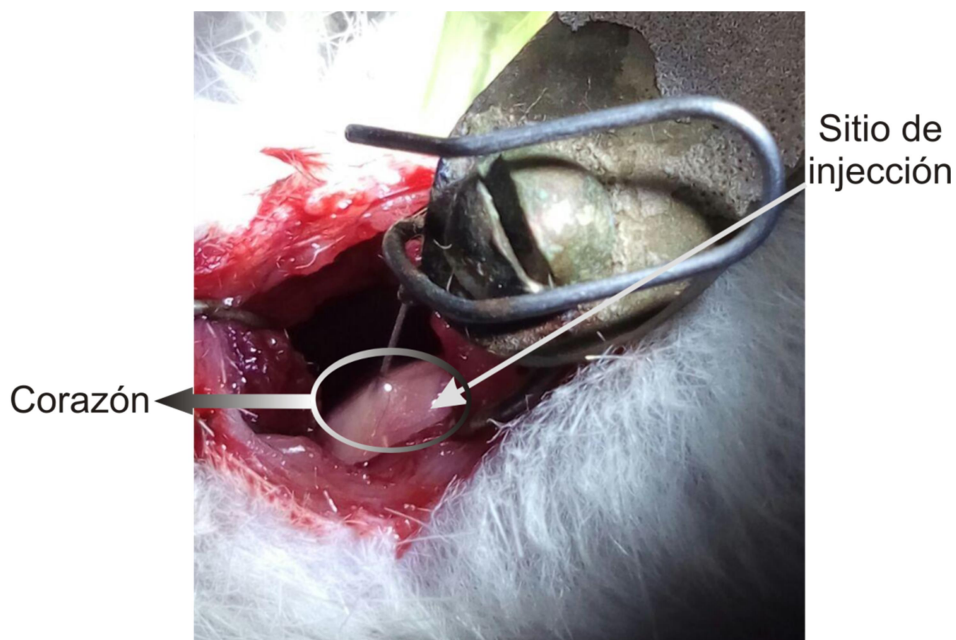


**Figura 10. Cuantificación de lentivirus infectivos.** A partir de diluciones seriadas de lentivirus concentrado se infectaron células HEK293T. Las células se vieron en microscopio de fluorescencia, las fotos (20X) son representativas de tres diluciones diferentes

#### 4. Inyección de los vectores lentivirales:

La administración del lentivirus silenciante se realizó en el espesor de la pared ventricular izquierda del corazón de las ratas bajo anestesia general (inhala ción de sevoflurano 5 % para inducción, y 2.5 % para mantenimiento mediante respirador mecánico) 7 días antes del implante de la mini bomba. A través de una incisión se expuso el corazón y se inyectó aproximadamente 200  $\mu$ l del lentivirus ( $\sim 2 \times 10^8$  unidades de transducción en volumen de con una multiplicidad de infección de  $\sim 80$ ) en dos sitios de la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo con jeringa de insulina y aguja de 30G, siguiendo el protocolo experimental descrito por otros autores[70, 72, 73]. Luego se cerró el tórax por capas y se permitió la recuperación de los animales sobre una almohadilla termosta tizada. Una vez recuperados se los devolvió a una sala especial dentro del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas.

. En la **Figura 11** se muestra una foto del procedimiento, donde se puede observar en el sitio de inyección que la solución administrada se encuentra en la pared, asegurándonos de esta manera que no entra en la cavidad.



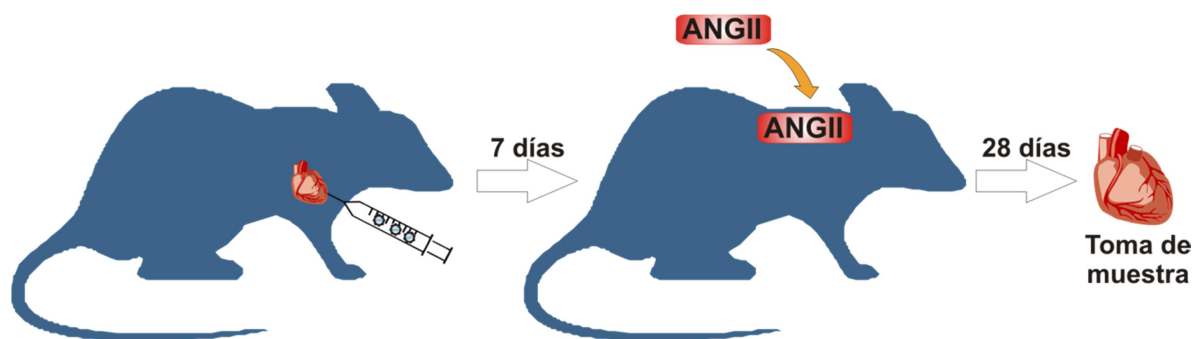
**Figura 11.** Foto de la cirugía donde se muestra la inyección de lentivirus en la pared del ventrículo izquierdo

#### **5. Inducción de HC patológica por administración de ANGII**

Una semana después de la inyección intramiocárdica se implantó de manera subcutánea una minibomba osmótica (modelo Alzet 2004) a la cual se le agregó ANGII disuelta en solución fisiológica estéril. Para implantar las minibombas se utilizó anestesia liviana (sevofluorano 5% por vía inhalatoria) que se mantuvo a través de una máscara (1,5 % sevofluorano). Previo al implante se desinfectó la piel de la zona entre las orejas con alcohol 70%, se realizó una incisión de 0.5 cm de longitud y se colocó la minibomba osmótica. Por último se cerró y se volvió a desinfectar la zona del implante. Se dejó al animal sin anestesia para que se recupere. Este modelo de minibomba libera 0,25  $\mu\text{l/h}$  y se cargó con 200  $\mu\text{g/kg/día}$  de angiotensina II.

Transcurridos veintiocho días desde el implante de la minibomba se procedió al sacrificio del animal, a la recolección de muestras y evaluación de parámetros hipertróficos.





**Figura 12. Esquema del protocolo experimental.** Ratas Wistar macho de 5 meses de edad fueron inyectadas con 200  $\mu$ l de lentivirus concentrado y luego de una semana se procedió al implante de la minibomba osmótica cargada con ANGII para la inducción de HC patológica.

## 6. Determinación del área de cardiomiocitos y colágeno.

Análisis del área de sección transversal: Secciones de corazón obtenidas del ecuador del ventrículo izquierdo fueron fijadas en formaldehído al 10% y embebidas en parafina. A las mismas se las tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el área de sección transversal de los cardiomiocitos (STC) o con la técnica de rojo de Picrosirius para cuantificar la fracción volumétrica de colágeno[24]. Todas las secciones teñidas se observaron en el microscopio (Olympus BX-50, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital, y procesadas con un programa de morfometría (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MA). La STC se determinó en 50 células de cada animal, seleccionadas aleatoriamente. Sólo fueron considerados aquellos cardiomiocitos que mostraban un núcleo evidente en la sección transversal. La fracción de volumen de colágeno se calculó como la suma de todas las áreas de tejido conectivo de las secciones, divididas por la superficie total de la sección. El colágeno perivascular fue excluido de esta medida.

## 7. Especies reactivas del oxígeno

### 7.1. Medición de la producción de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Se trabajó con tiras delgadas de ventrículo izquierdo (1x5 mm), y se midió la producción de anión superóxido mediante el método de quimioluminiscencia por

lucigenina. Las tiras de corazón fueron incubadas en buffer de lucigenina en ausencia o presencia de aldosterona (10 nmol/L) y factor de crecimiento endotelial (EGF) (0,1 µg/mL), durante 30 min en una incubadora a 37°C con 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>. La quimioluminiscencia en unidades arbitrarias fue registrada con un luminómetro (Chameleon; Hidex; Finland) durante 30 s cada 4,5 min por un período total de 30 min. La producción de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> fue normalizada por mg de tejido seco y expresada por min.

### **7.2. Peroxidación lipídica.**

La peroxidación lipídica fue determinada midiendo la tasa de producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), expresada en nmol/mg de tejido. Homogenatos de corazón fueron centrifugados a 2.000 rpm por 10 min. 0,5 ml del sobrenadante se mezcló con 1,5 ml de ácido tricloroacético (30% p/v), 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,7% p/v) y 0,5 ml de agua, luego de lo cual se hirvió la mezcla por 15 min. Luego de enfriar las muestras, se midió la absorbancia a 535 nm.

### **7.3. Actividad de NADPH oxidasa (NOX)**

Se midió la producción de superóxido dependiente de NOX en homogenatos de ventrículo izquierdo de ratas de los tres grupos experimentales, usando la técnica de quimioluminiscencia por lucigenina. Las proteínas fueron diluidas en buffer HEPES y distribuidas (100 µl/pocillo) en una microplaca de 96 pocillos. Se agregó NADPH (100 µmol/L) a los pocillos y se efectuó la lectura con el luminómetro, durante 15 min. La actividad de NOX medida por producción de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> fue expresada en cpm/mg de proteína.

## **8. Ecocardiografía**

Se realizaron registros ecocardiográficos en las ratas de todos los grupos experimentales inmediatamente antes de iniciar los protocolos y previamente a su sacrificio. Para ello se las sometió a anestesia liviana (sevoflurano 5% por vía inhalatoria) y se les depiló la zona torácica para la aplicación de gel ultrasónico. Mediante el uso de transductor de 15 mHz se realizó un electrocardiograma transtorácico, obteniéndose imágenes bidimensionales de planos equivalentes al eje corto paraesternal en humanos.

A partir de esas imágenes, seleccionando las de mejor resolución, se realizó un registro en modo M a velocidad de barrido de 50 mm/seg. Las imágenes congeladas en modo M se digitalizaron para realizar las determinaciones off-line.

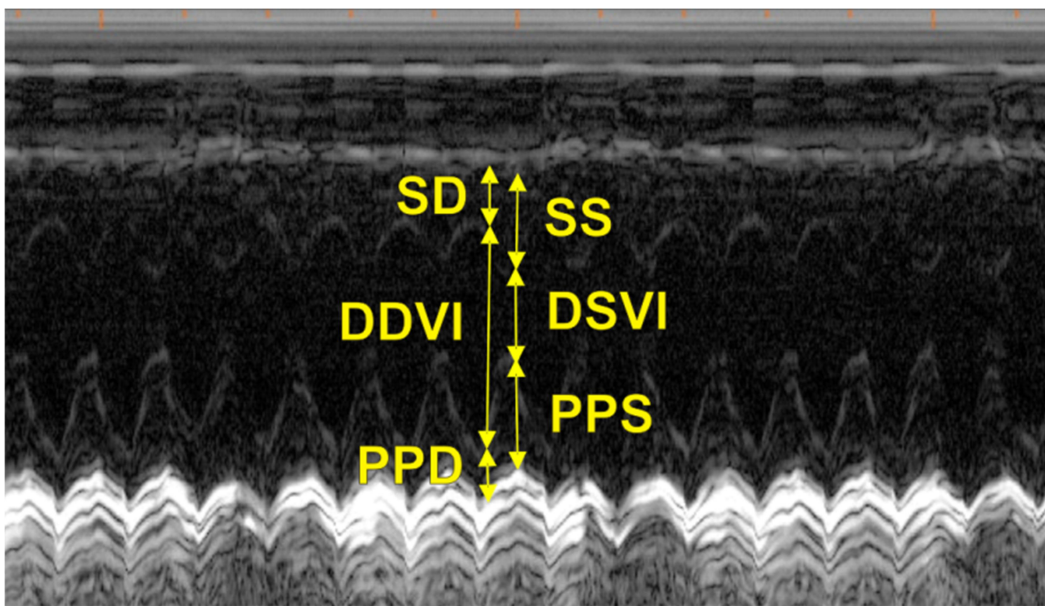
Las mediciones para el análisis de la estructura y función del ventrículo izquierdo fueron efectuadas en 3 latidos consecutivos, de acuerdo a las recomendaciones de la American Society of Echocardiography.[74] El período de eyección del ventrículo izquierdo se midió en el registro de flujo de la válvula aórtica. De cada registro se tomaron los siguientes parámetros: DDVI o diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo, DSVI o diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo, SD o espesor diastólico del tabique interventricular, SS o espesor sistólico del tabique interventricular, PPD o espesor en diástole de la pared posterior del ventrículo izquierdo y PPS o espesor sistólico de la pared posterior del ventrículo izquierdo. El espesor parietal relativo (h/r) y el acortamiento endocárdico (AEnd) se calcularon según las siguientes fórmulas:

Espesor parietal relativo:

$$h/r = \left( \frac{PPd \times 2}{DDVI} \right)$$

Acortamiento endocárdico:

$$AEnd (\%) = \left( \frac{DDVI - DSVI}{DDVI} \right) \times 100$$



**Figura 13. Ecocardiografía modelo.** En la imagen se indican los parámetros calculados: septum en diástole (SD) y en sístole (SS), diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (DDVI) y en sístole (DSVI), pared posterior en diástole (PPD) y en sístole

## **9. Determinación de la presión arterial.**

Se realizaron dos registros semanales de presión arterial de los animales con implantación de bomba de ANGII y sus controles (administración de solución fisiológica) durante el mes de tratamiento con el lentivirus. Para la medida se utilizó el método indirecto de la cola [75].

## **10. Medición de pH intracelular**

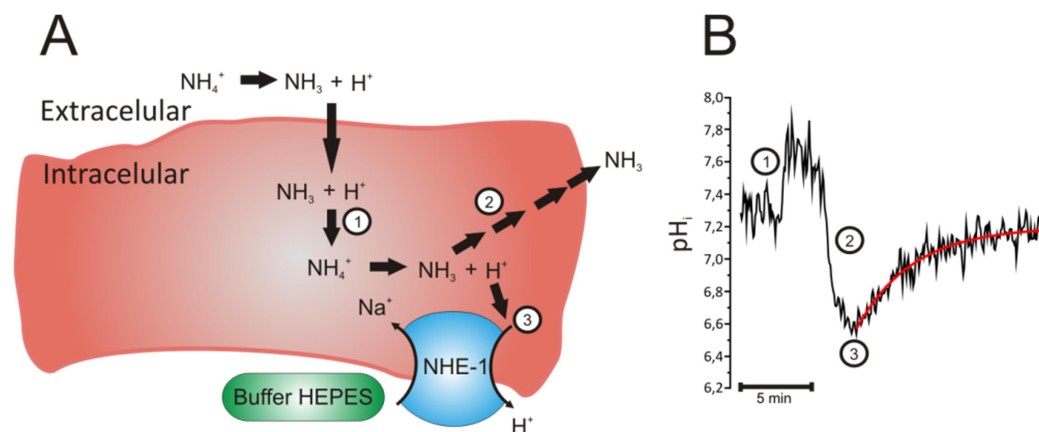
A  $\text{pH}_i$  fisiológico de  $\sim 7,2$  la actividad del NHE-1 es escasa, siendo el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (isoformas electrogénica y electroneutra; NBCe1 y NBCn1, respectivamente) el mecanismo alcalinizante que más aporta en su regulación. En un contexto de acidosis, como puede ser durante isquemia, la participación del NHE-1 en la regulación del  $\text{pH}_i$  aumenta significativamente y la contribución del NBC es menor. Por ello, para cuantificar la actividad del NHE-1 se recurrió a la técnica de prepulsos de amonio, que genera acidosis intracelular durante el lavado de la solución de  $\text{NH}_4^+$  (punto 2 de la **Figura 14**).

La medición de  $\text{pH}_i$  se realizó mediante la técnica de epifluorescencia con 2'-7'-bis (2 carboxyethyl) 5',6'-carboxyfluoresceína (BCECF-AM) empleando un microscopio adecuado (Ion Optix, Milton; MA). Células de la línea HEK293T cultivadas en vidrios, fueron utilizadas para corroborar la eficiencia de silenciamiento del l-shNHE1. Estas se incubaron con el indicador fluorescente (5  $\mu\text{mol/L}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 minutos en oscuridad y luego se lavaron en buffer HEPES.

Composición del buffer HEPES en g/L: NaCl 8.54; KCl 0.35; glucosa 2; Hepes 2.39;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.047;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.258

Una vez cargadas, los vidrios se colocaron en una cámara de perfusión sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon y Olympus CK2 respectivamente). Se perfundió continuamente a una velocidad de 1.33 ml/min a temperatura ambiente. Los

experimentos se realizaron en presencia de buffer HEPES libre de bicarbonato (para eliminar los efectos del NBC sobre el  $\text{pH}_i$ ).



**Figura 14.** Fundamento de la técnica de prepulsos de amonio. El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el medio extracelular se disocia a amoníaco ( $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ ). El  $\text{NH}_3$  difunde por la membrana plasmática de la célula hacia el interior de la misma, produciendo la captación de protones intracelulares, lo que genera un aumento en el  $\text{pH}_i$  [76]. Luego durante el lavado con buffer sin  $\text{NH}_4^+$ , se produce la acidificación del interior celular ya que el  $\text{NH}_3$  en equilibrio con el  $\text{NH}_4^+$  difunde hacia el exterior (2), produciendo disminución del  $\text{pH}_i$ . Los  $\text{H}^+$  quedan en el interior de la célula en una concentración tal que activa al NHE-1, liberándolos al medio extracelular con intercambio de  $\text{Na}^+$ , generando así la recuperación del  $\text{pH}_i$  (3).

Debido a que en HEK293T la expresión del intercambiador NHE-1 es menor que en cardiomiocitos[77, 78], se transfectó por el método de fosfato de calcio con un plásmido que codifica para el NHE-1 de rata, de esta manera las células sobreexpresan el intercambiador.

## 11. Análisis de expresión de proteínas

Para observar la expresión de proteínas se realizaron homogenatos de ventrículo izquierdo a partir de muestras de miocardio congeladas a las cuales se les agregó 5 volúmenes de buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa s como ortovanadato de sodio, PMSF, cocktail de inhibidores según las indicaciones del fabricante. Se realizaron 3 pasos de homogenización en baño de hielo con homogeneizador de tejidos Polytron (Brickmann PCU11) siendo de 10 segundos cada uno, con 30 segundos de espacio entre cada uno. Luego se centrifugó el

homogenato a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se congelo en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C.

#### **11.1. Determinación de concentración de proteínas**

Para la medida de concentración de proteínas se empleó el método de Bradford (BioRad Protein Assay) siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo de diluciones apropiadas de las muestras se realizaron las determinaciones por triplicado, midiendo la absorbancia a 595nm en espectrofotómetro (SmartSpect 3000 BioRad). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración hecha con 3 diluciones de seroalbúmina bovina (SAB) (Natocor).

#### **11.2. Determinación de expresión de NHE-1, GAPDH**

Para evaluar la expresión de NHE-1 y GAPDH se utilizó la técnica de Western Blot.

Para la preparación de las muestras, las mismas se descongelaron en baño de hielo y una vez descongeladas se tomó el volumen adecuado según la proteína a analizar y se procedió a la desnaturalización y preparación para ser sometidas a la electroforesis agregando buffer de muestra (Thermo Fisher), DTT (10%) y volumen adecuado de agua bidestilada para llegar a un volumen final común. Las muestras se desnaturalizaron en baño termostático por 10 minutos a 70°C.

Las proteínas se separaron electroforéticamente utilizando la cuba electroforética (BioRad Mini-PROTEAN® Systems) en geles de poliacrilamida (Laemmli 10%) en solución buffer. Se sembró un volumen adecuado de muestras en el gel y 6 µl de marcador de pesos moleculares (BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standards). La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente y a 120 V. La corrida se prolongó durante el tiempo necesario para que el frente de corrida alcance el extremo del gel (aproximadamente 1 hora 45 minutos).

Para la transferencia, las proteínas separadas por peso molecular fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore) y se utilizó buffer de transferencia. Las

membranas se activaron sumergiéndolas en metanol durante 30 segundos, luego se las enjuagó con agua bidestilada y se las dejó equilibrar en buffer de transferencia, al igual que los papeles de filtro y las esponjas necesarias para la transferencia. Esta última se realizó en una cuba con baño de hielo utilizando el tiempo y voltaje necesarios para la transferencia. Una vez finalizada, se retiraron las membranas y se bloquearon con solución T-TBS 5% leche descremada durante 1 hora en agitación.

**Incubación con anticuerpos:** una vez bloqueada la membrana se procedió al enjuague de la misma para eliminar el exceso de solución de bloqueo y las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario contra la proteína de interés (anticuerpo anti NHE-1: Santa Cruz Biotechnology, sc-28758 anti conejo dilución 1:1000 en T-TBS 1 % SAB; anti GAPDH: Millipore, MAB374 anti ratón dilución 1:1000 en T-TBS 1% SAB; sc-16982 anti conejo dilución 1:1000 en T-TBS 1% SAB). Las membranas con sus respectivos anticuerpos fueron incubadas durante la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la sustracción del anticuerpo primario y lavado del remanente en la membrana con T-TBS (4 lavados de 4 minutos cada uno). Una vez eliminado el anticuerpo primario, se siguió con la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, el cual tiene acoplado la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y está diseñado con la fracción Fc específica de la especie de la cual se obtuvo el anticuerpo primario (anti conejo; anti ratón). Esta incubación tuvo una duración de una hora en agitación a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se procedió al lavado de la membrana de la misma manera que se hizo con el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: contra conejo (NA934, GE Healthcare Life Sciences) y contra ratón (NA931, GE Healthcare Life Sciences)

**Revelado:** se utilizó el sistema de detección Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se basa en la generación de éster de acridino a partir de un sustrato, agua oxigenada y la HRP, en condiciones alcalinas esta sustancia se oxida produciendo un producto que emite una

señal quimioluminiscente que puede ser detectada y cuantificada. Para la detección se utilizó el equipo Chemidoc XRS (Bio Rad) que captura y digitaliza las imágenes.

La cuantificación se realizó por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH).

Composición Buffer T-TBS: 50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl pH 7.5

## **12. Expresión de ARNm por RT-qPCR**

**Aislamiento de ARNm.** A partir de 20-30 mg de tejido aproximadamente previamente guardado en solución RNAlater (Qiagen) a -80°C para su preservación, se obtuvo ARN total utilizando TRIzol Reagent (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este protocolo se utilizaron puntas de pipeta con filtro y agua libre de nucleasas para prevenir la contaminación y/o degradación a la que es susceptible el ARNm.

Para la determinación de la concentración de ARNm por espectrofotometría se utilizó el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), a partir de una alícuota de 1 µl de muestra. El equipo permite medir, además de la concentración, la pureza del ARNm mediante la determinación de la relación de absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) la cual si es del orden de 2 se considera que el ARN obtenido es puro.

**Transcripción reversa.** A partir de esta reacción se obtiene una cadena de ADN complementaria a la del ARNm que codifica el gen de interés, en nuestro caso, los genes de interés fueron los que codifican para NHE-1, BNP y GAPDH. Este último se utilizó como normalizador ya que se expresa constitutivamente. El ADN obtenido (ADN complementario o ADNc) sirve como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este procedimiento se utilizó la enzima M-MLV (Thermo Fisher 28025-013), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pasos de la reacción incluyen: a) hibridación del cebador antisentido correspondiente al gen que se desea observar sus niveles de expresión, siendo esta reacción específica para cada gen, a diferencia de otras maneras de obtener el ADNc donde los cebadores permiten la transcripción reversa de todos los



ARNm presentes. b) retrotranscripción, la cual consiste en la síntesis de la cadena de ADNc utilizando como molde ARNm. c) inactivación de la enzima 15 minutos a 70°C.

**PCR en tiempo real:** Este método se basa en los fundamentos de una PCR estándar, sumado a la posibilidad de cuantificar la amplificación de los fragmentos de ADN (15-20 pb) durante el transcurso de la reacción mediante fluorescencia y así poder estimar la cantidad inicial de ADNc usado como molde. Como cualquier PCR, este método consiste en ciclos sucesivos de desnaturalización de ADN doble cadena, hibridación de los cebadores con el molde, síntesis de la cadena complementaria mediante la enzima ADN polimerasa termoresistente (Taq polimerasa, Inbio Highway) y nuevamente desnaturalización de la doble hebra para luego realizar otro ciclo.

En cada ciclo la cantidad de ADN se duplica, siendo el “N” el número de copias, “n” el número de ciclo, por lo que se podría calcular el número de copias en n ciclos a partir de la ecuación  $N_n = N_0 \times 2^n$ , donde  $N_0$  es número de copias iniciales de ADN. El crecimiento exponencial del número de copias ocurre hasta que los reactivos estén en defecto o se produce inhibición por producto. La PCR en tiempo real se lleva a cabo en un termociclador que posee un detector óptico que mide la fluorescencia en cada ciclo y en cada reacción individual. En este trabajo se utilizó SYBR Green I (Molecular Probes) que emite fluorescencia a 490 nm al unirse al surco menor del ADN doble cadena. El ciclador permite programar las condiciones para obtener la lectura de la fluorescencia en cada ciclo al finalizar la etapa de polimerización y antes de la etapa de desnaturalización de la doble hebra. De esta manera, se obtiene para cada reacción individual una curva de amplificación, que se define como la curva de fluorescencia en función del número de ciclos, la cual consta de 1) una fase inicial donde la fluorescencia es baja por lo tanto el detector no es capaz de medir los cambios producidos por la amplificación de ADN, por lo que la señal se mantiene constante; 2) una fase exponencial donde se observa el mayor crecimiento de fluorescencia con el número de ciclos; 3) una fase estacionaria o meseta donde la fluorescencia es constante o sube muy lentamente.

La fase inicial de la curva de amplificación define una línea de base por encima de la cual se detecta la acumulación del producto de la reacción. Se establece arbitrariamente un umbral por encima de esta línea de base, definido como ciclo umbral, el cual es el número fraccional de ciclos en el que la fluorescencia corta la línea umbral.

Cada reacción de amplificación se realizó por triplicado para cada gen de interés (NHE-1, BNP, GAPDH), partiendo de una dilución 1/10 del producto obtenido en la retrotranscripción. Las reacciones se prepararon en placas de 96 pocillos, con las siguientes concentraciones de reactivos:

dNTPs: 0.2 mM de cada uno (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

MgCl<sub>2</sub>: 1.5 mM

Fluoresceína (Bio-Rad): 10 nM

SYBR Green I (Molecular Probes): dilución 1/1000

Cebadores (Tecnolab): 0.5 µM de cada uno (Sentido y antisentido)

Taq ADN polimerasa (Inbio Highway)

ADNc molde: dilución 1/10 de la RT

Buffer de reacción: 10% del volumen final

Por otro lado, se realizó una curva de eficiencia para cada gen de interés con diluciones de una mezcla constituida por los productos de la retrotranscripción obtenidos. Cada punto de la curva se realizó por triplicado. Como control negativo se prepararon mezclas de reacción que en lugar de tener ADNc molde se les agregó la misma cantidad de agua bidestilada estéril. Una vez cargadas todas las mezclas de reacción se cubrió la placa con film óptico (Bio-Rad) y se llevó a cabo la reacción en un equipo de PCR en tiempo real (iCycler, Bio-Rad).

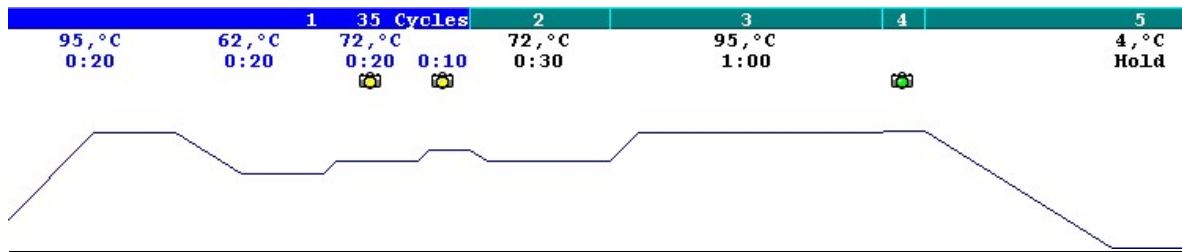
Al concluir la reacción, los datos colectados por el software del equipo (Real Time Detection System Software 3.0) fueron analizados.

En la **Tabla 2** figuran las secuencias de los cebadores utilizados tanto para la síntesis de ADNc, como para la PCR en tiempo real.

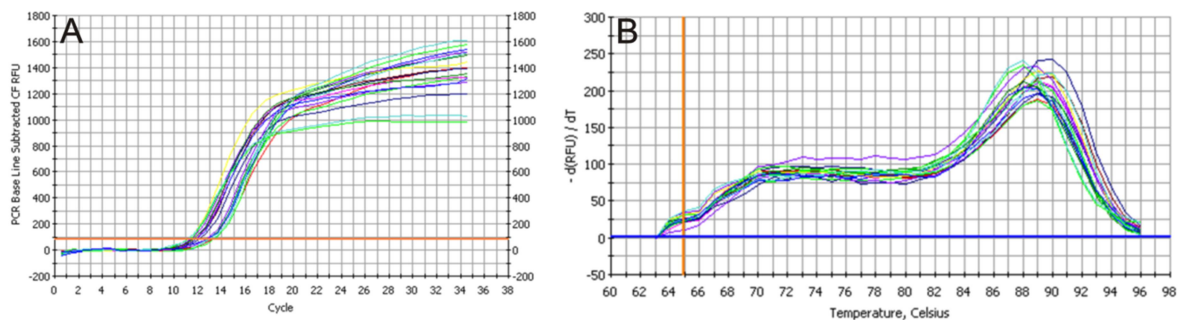
En la **Figura 15** se muestra el programa de amplificación de los genes de interés.

Gen	Sentido	Antisentido
NHE-1	5`-TCACCACAGCTCCATCAGAG-3`	5`-GATCTCGAAGGGTGTCCGTA-3`
BNP	5`-CCCAGATGATTCTGCTCCTG-3`	5`-TTCTGCATCGTGGATTGTTC-3`
GAPDH	5`-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3`	5`-CCACAGTCTTCTGAGTGGCA-3`

**Tabla 2.** Secuencia de los primers utilizados para amplificar fragmentos específicos de ARNm mediante PCR en tiempo real



**Figura 15.** Protocolo de temperatura utilizado. En el paso 1 se produce la desnaturalización del ADN doble cadena a 95° C, luego baja la temperatura hasta 55° C lo que permite la hibridación de los cebadores con la cadena molde y a 72° C comienza la polimerización de las cadenas de ADN. Se toman lecturas de fluorescencia en los últimos 10 segundos de polimerización y 10 segundos adicionales a 81° C. El ciclo completo se repite 35 veces. El paso 2 tiene como finalidad completar la polimerización. El paso 3 y 4 consiste en una rampa de disminución de la temperatura de 1° C por cada 1 minuto y se toma la lectura de florescencia en los últimos 10 segundos, de esta manera de construye la curva de melting. En el último paso la temperatura baja hasta 4° C y se mantiene constante hasta sacar la placa de PCR del equipo.



**Figura 16. A.** Curvas de amplificación: fluorescencia en función del número de ciclos de PCR. En los primeros ciclos no se detectan cambios en la fluorescencia ya que no supera el límite de detección inferior del equipo. A medida que aumenta el número de ciclos la fluorescencia comienza a crecer de manera exponencial y este aumento se hace más lento o la fluorescencia permanece constante. La intersección de la curva con la línea umbral permite calcular el ciclo umbral que se utiliza para el cálculo de la expresión relativa del gen de interés. **B.**  $(-dF/dT)$  en función de la temperatura. La presencia de un solo pico indica que sólo un producto ha sido amplificado

### **13. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media  $\pm$  Error Standard (ES). El análisis estadístico usado dependió del protocolo experimental. Las comparaciones fueron realizadas por test de t de Student para datos apareados o independientes, cuando se compararon dos grupos diferentes.

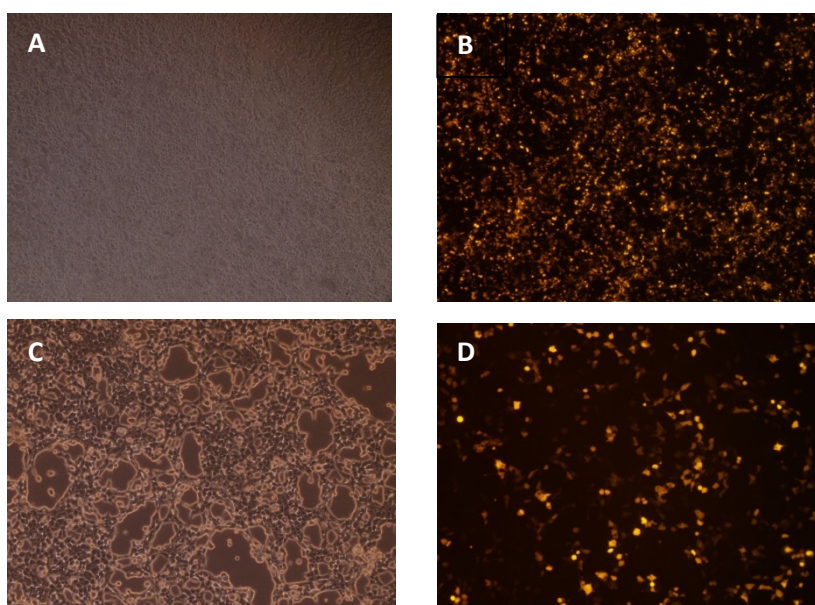
Para la comparación de más de dos intervenciones diferentes se usó ANOVA de una vía para muestras desapareadas seguido de un test de Student-Newman-Keuls.

Se utilizó el programa Origin 8 (OriginLab Corp.) y Graph Pad 6 para realizar los análisis estadísticos. Un valor  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo

# RESULTADOS

### **Producción de las partículas lentivirales l-shNHE1 y l-shSCR**

Utilizando los plásmidos purificados mediante maxiprep se procedió a la transfección de células HEK293T (con aproximadamente 60% de confluencia) utilizando el método del fosfato de calcio. Para corroborar si las células habían sido efectivamente transfectadas, luego de 24 horas se observó en microscopio invertido la presencia de células rojas, ya que uno de los plásmidos codifica la proteína fluorescente roja (DsRed). Como se observa en la **Figura 17** las células fueron transfectadas eficientemente ya que presentaban abundante coloración roja.



**Figura 17.** Células HEK293T transfectadas con los tres plásmidos que codifican proteínas estructurales del lentivirus y el plásmido portador del siRNA contra el NHE-1 (A y B). En las fotos C y D se ven células transfectadas para generar el virus l-shSCR. En los paneles A y C se muestran fotos representativas de las células en campo claro. En los paneles B y D fotos de las células que incorporaron los plásmidos (células que presentan coloración). Aumento de las imágenes 100X.

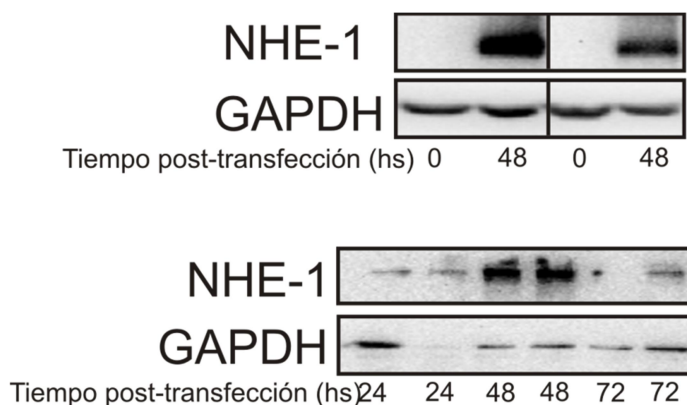
### **Evaluación de la eficiencia de silenciamiento del lentivirus**

Luego de transfectar las células se recolectó el medio de cultivo a las 24, 48 y 72 hs post-transfección y se purificó el lentivirus mediante ultracentrifugación.

## Resultados

Para calcular el título de partículas infectivas se transducieron HEK293T con diluciones seriadas de los virus. Luego de 72 hs. se observó por microscopia de fluorescencia el número de células rojas, ya que el gen de la proteína fluorescente roja asociado a los ARN (shNHE1 y shSCR) se integra en el genoma de las células. A partir del número de células rojas presentes en cada dilución se calculó la concentración de virus. En la mayoría de los casos fue del orden de  $10^9$  UT/ml (unidades de transducción por mililitro).

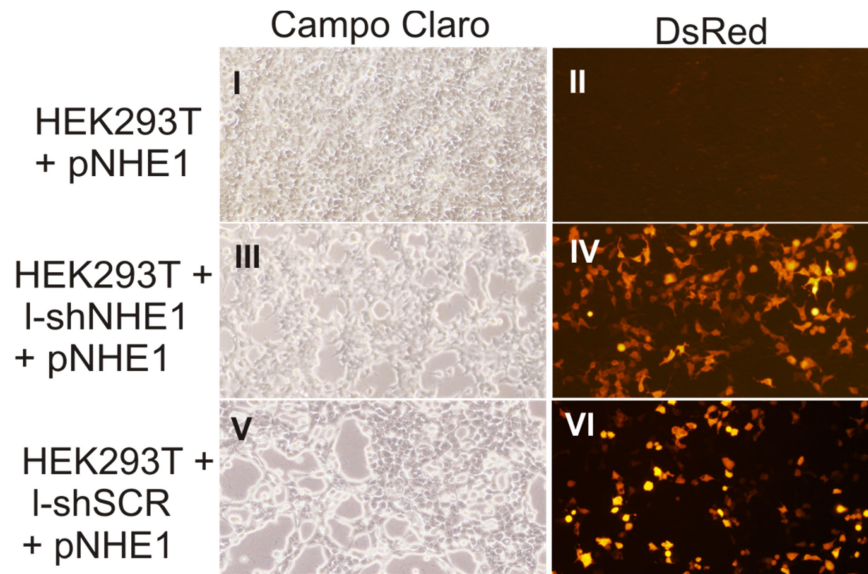
Una vez purificado y obtenido el título de l-shNHE1, se evaluó su eficiencia para silenciar el NHE-1. Para ello se transducieron células HEK293T con 10  $\mu$ l del-shNHE1 concentrado, utilizando como control l-shSCR. Como esta línea celular posee una expresión reducida del intercambiador, las células se transfectaron además con un plásmido (pNHE1) que permite sobreexpresar el NHE-1 y posee un pico de expresión a las 48 hs (**Figura 18**). Debido a esto se procedió de la siguiente manera para observar la eficiencia de silenciamiento del l-shNHE1: se infectaron las células con el lentivirus correspondiente (l-shNHE1 o l-shSCR) y luego de 24 hs se les cambió el medio de cultivo por medio fresco para posteriormente transfectarlas con el plásmido pNHE1. Una vez pasadas 48 hs post-transfección se realizaron los análisis correspondientes.



**Figura 18.** WB representativos de niveles de expresión del NHE-1 en células HEK293T transfectadas con pNHE1 a diferentes tiempos

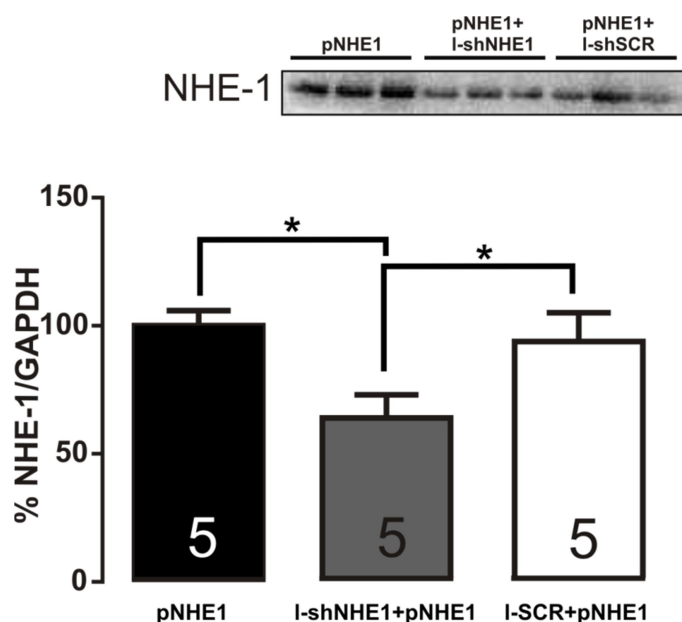


En la **Figura 19** se muestra la capacidad infectiva de los virus, donde las células con fluorescencia roja son las que incorporaron el material genético.



**Figura 19. A. B.** Silenciamiento del NHE-1 en células HEK293T transfectadas con el plásmido pNHE1. En los paneles I, III y V se muestran fotos representativas en campo claro y en II, IV y VI fotos obtenidas por microcopia de fluorescencia. Los paneles I y II muestran células sin infectar mientras que en III-IV, y V-VI se visualizan células infectadas con I-shNHE1 y I-shSCR, respectivamente. Los tres grupos fueron transfectados con el plásmido pNHE1. Aumento 100X.

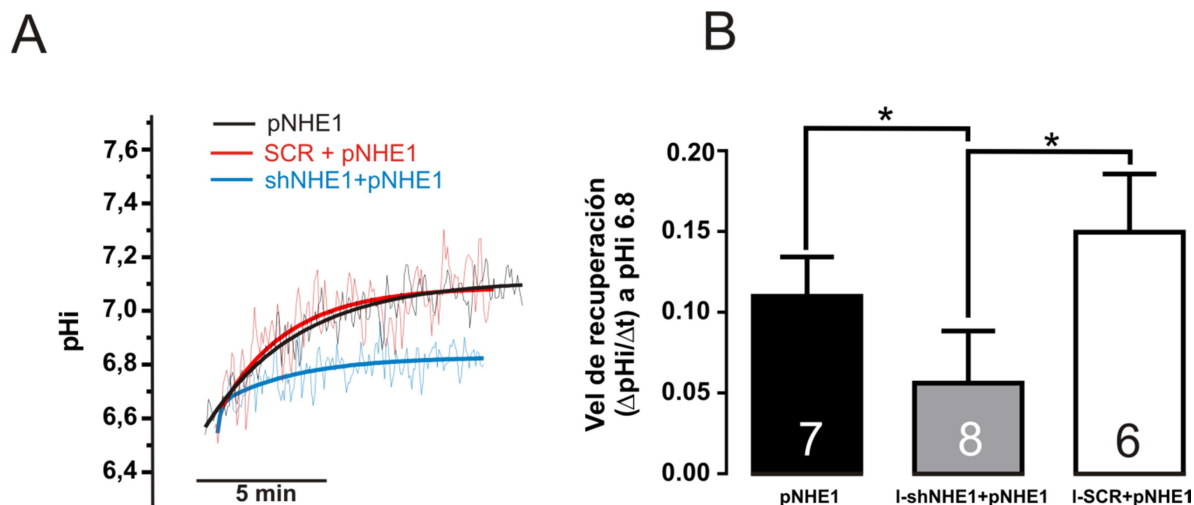
## Resultados



**Figura 20. Expresión de NHE-1 en células HEK293T.** Células HEK293T transfectadas con el plásmido pNHE-1 y/o infectadas con los respectivos lentivirus. Homogenatos de cada grupo fueron utilizados para observar expresión proteica del NHE-1 mediante Western Blot. Gel representativo y barras promedios. Dentro de las barras se especifica el número de cultivos de cada grupo. (\*indica  $p < 0,05$ , análisis ANOVA de una vía, l-shNHE1+pNHE1 vs pNHE1 y l-shNHE1+pNHE1 vs l-SCR+pNHE1)

Para observar la expresión del NHE-1 en células HEK293T se realizaron lisados proteicos de las mismas transcurridas 72 hs post-infección. A partir de estos, se procedió a verificar la expresión del NHE-1 por Western Blot. Por otro lado, se evaluó la actividad del intercambiador mediante microscopia de epifluorescencia, utilizando células cultivadas sobre pequeños vidrios cubreobjetos expuestas a los mismos tratamientos que las utilizadas para los lisados proteicos.

A partir de las técnicas mencionadas anteriormente, se observó que la expresión del NHE-1 se redujo aproximadamente en un 35% en las células infectadas con l-shNHE1, comparado con los grupos control (pNHE1 y pNHE1+l-shSCR) (**Figura 20**).



**Figura 21. Actividad del intercambiador NHE-1.** **A.** Imagen representativa de la recuperación de pHi luego de una carga ácida. **B.** Barras promedio de la velocidad de recuperación a pHi 6,8. Dentro de las barras se especifica el número de cultivos de cada grupo. (\*indica  $p < 0,05$ , análisis ANOVA de una vía, I-shNHE1+pNHE1 vs pNHE1 y I-shNHE1+pNHE1 vs I-SCR+pNHE1)

En cuanto a la actividad del NHE-1, se observó que disminuyó significativamente en el grupo de células pNHE1+l-shNHE1. Esta disminución de la actividad se verificó al calcular la velocidad de recuperación del pHi luego de una carga ácida (inducida mediante la técnica del prepulso con  $NH_4^+$ ). Este parámetro fue significativamente menor en el grupo pNHE1+l-shNHE1 comparada con la obtenida en los grupos pNHE1 y pNHE1+l-shSCR (Figura 21).

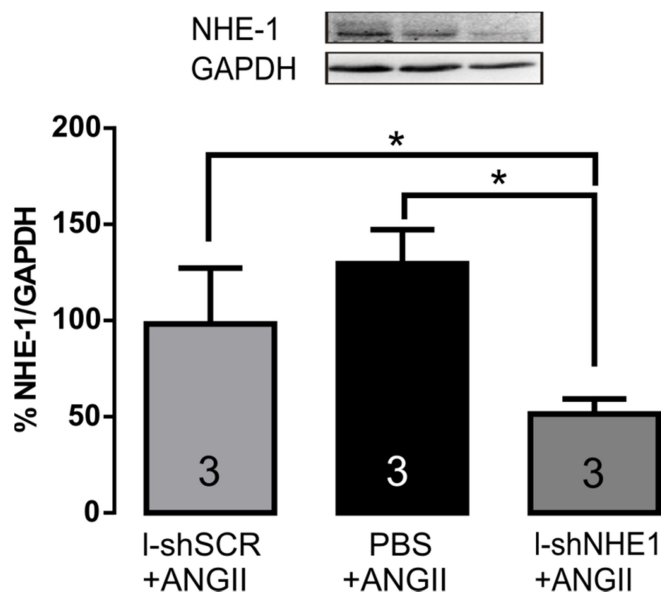
*Estos resultados permiten corroborar que el virus I-shNHE1 es una buena herramienta para disminuir de manera significativa la expresión y función del intercambiador NHE-1.*

### Silenciamiento del NHE-1 en un modelo *in vivo*

Una vez demostrado el éxito del silenciamiento *in vitro* del lentivirus producido, se prosiguió con su utilización *in vivo*. En el caso de este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho de 5 meses de edad.

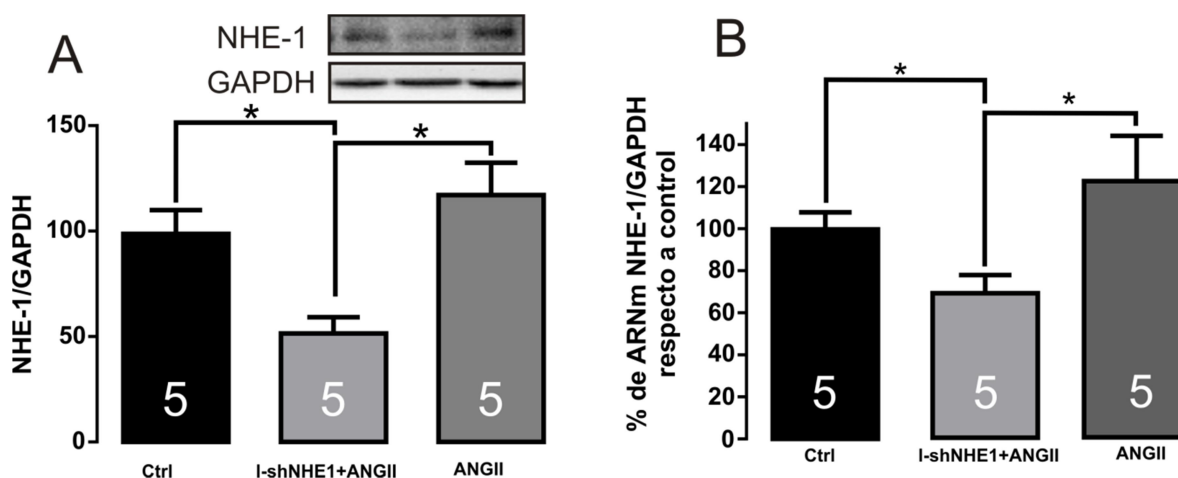
En experimentos preliminares se evaluó el efecto de la inyección intramiocárdica directa de I-shSCR o PBS. Dado que, tal como se muestra en la **Figura 22**, no se observaron

diferencias significativas en la expresión miocárdica del NHE-1 entre ambos grupos al finalizar el protocolo experimental, se decidió utilizar la inyección con PBS como control negativo a fin de optimizar la utilización de recursos económicos.



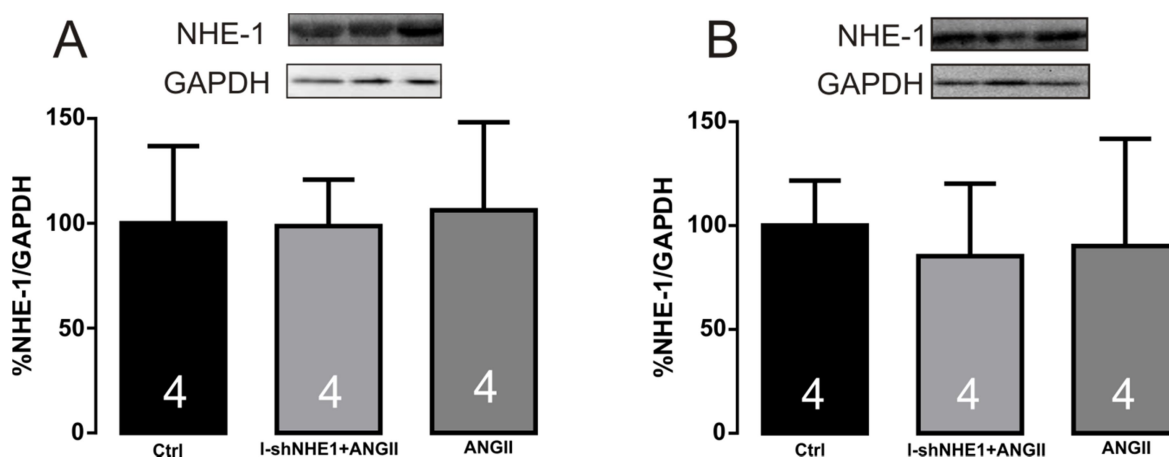
**Figura 22.** Expresión proteica de NHE-1 en ventrículo izquierdo de ratas inyectadas con I-shSCR, PBS y I-shNHE1 y sometidas a infusión con ANGII. Western blot representativo y resultados promedio normalizados con GAPDH. (\*indica  $p < 0,05$ ; I-shSCR+ANGII vs I-shNHE1+ANGII y PBS+ANGII vs I-shNHE1+ANGII, análisis ANOVA de una vía).

Como primera medida se evaluó el nivel de expresión del NHE-1 mediante Western blot, y se observó que la expresión del intercambiador disminuyó significativamente en el grupo inyectado con I-shNHE1, mientras que en los grupos Ctrl y ANGII no se observaron diferencias. Utilizando PCR en tiempo real, se corroboró lo obtenido mediante Western blot, donde se vió que los niveles de ARNm del NHE-1 fueron menores en el grupo inyectado con I-shNHE1 comparado con los dos grupos controles (**Figura 23A y B**). Además, a fin de confirmar que el efecto de silenciamiento se restringía exclusivamente al miocardio, se evaluó la expresión de NHE-1 en dos órganos distantes como son pulmón e hígado. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de NHE-1 en estos órganos entre los distintos grupos experimentales. (**Figura 24A y B**).



**Figura 23. Expresión de NHE-1 en ventrículo izquierdo.** A. Western blot representativo y resultados promedio normalizados con GAPDH. B. Expresión relativa de ARNm de NHE-1. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\*indica  $p < 0,05$ ; Ctrl vs I-shNHE1 y Ctrl vs ANGII, análisis ANOVA de una vía).

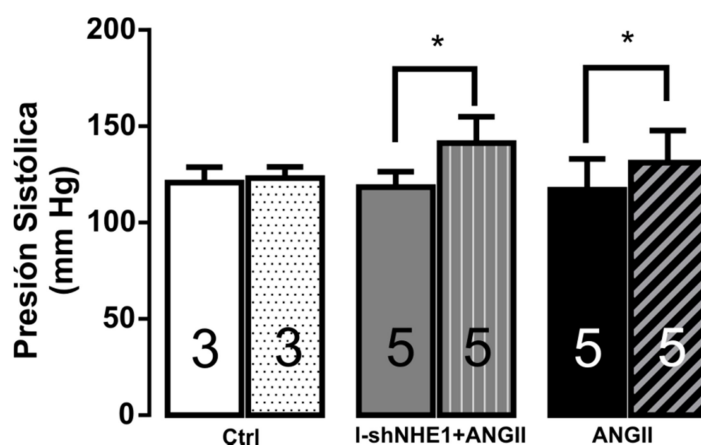
A partir de estos datos se pudo confirmar que la administración de I-shNHE1 produjo una disminución tanto a nivel de la proteína como del ARNm de aproximadamente 48% y 36 % respectivamente, respecto al grupo Ctrl. Por otro lado, se evidenció el efecto local del virus ya que la expresión del intercambiador no fue afectada en otros órganos.



**Figura 24.** Western Blots representativos y resultados promedio de la expresión de NHE-1 normalizados por GAPDH en pulmón (A) e hígado (B). No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación.

### **Efecto del silenciamiento de NHE-1 sobre la presión sistólica**

La presión arterial de las ratas pertenecientes a los tres grupos experimentales fue registrada antes de la inyección del lentivirus y luego en forma semanal hasta el sacrificio de los animales. Las diferencias entre el día 0 y el día 35 se muestran en la **Figura 25**. Se puede observar que la presión de las ratas Ctrl no se modificó en este período, mientras que la administración de ANGII indujo un aumento significativo de la presión arterial, lo cual era de esperar ya que es conocido el efecto vasopresor de este octapéptido. Resulta interesante el hecho de no haberse detectado diferencias en el comportamiento de la presión arterial entre los grupos que recibieron ANGII con o sin el lentivirus l-shNHE1, *demonstrando que el silenciamiento miocárdico del NHE-1 no tiene efecto sobre la presión arterial.*

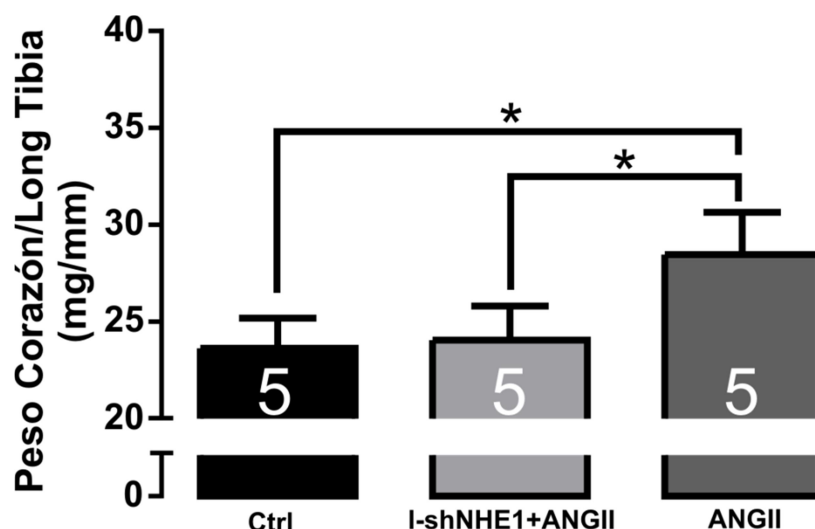


**Figura 25. Presión sistólica media.** Luego de 28 días de administración de ANGII se observó aumento en la presión sistólica. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\* Indica  $p < 0.05$ , t-test, antes vs después en cada grupo).

### **Evaluación de parámetros hipertróficos y ecocardiográficos**

Con el objetivo de evaluar el efecto del silenciamiento del NHE-1 sobre el desarrollo de HC patológica, se registró el peso del corazón y se midió la longitud tibia, una vez transcurridos los 35 días de tratamiento. La relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia de los animales tratados con l-shNHE1 fue significativamente menor comparada con la obtenida en el grupo ANGII (**Figura 26**;  $23,62 \pm 0,69$  para grupo control,

24,03±0,79 para I-shNHE1+ANGII y 28,45 ±0,98 para ANGII;  $p<0,05$ , ANOVA de una vía). A partir de este resultado podemos sugerir que la administración del I-shNHE1 impediría el desarrollo de hipertrofia inducida por ANGII.

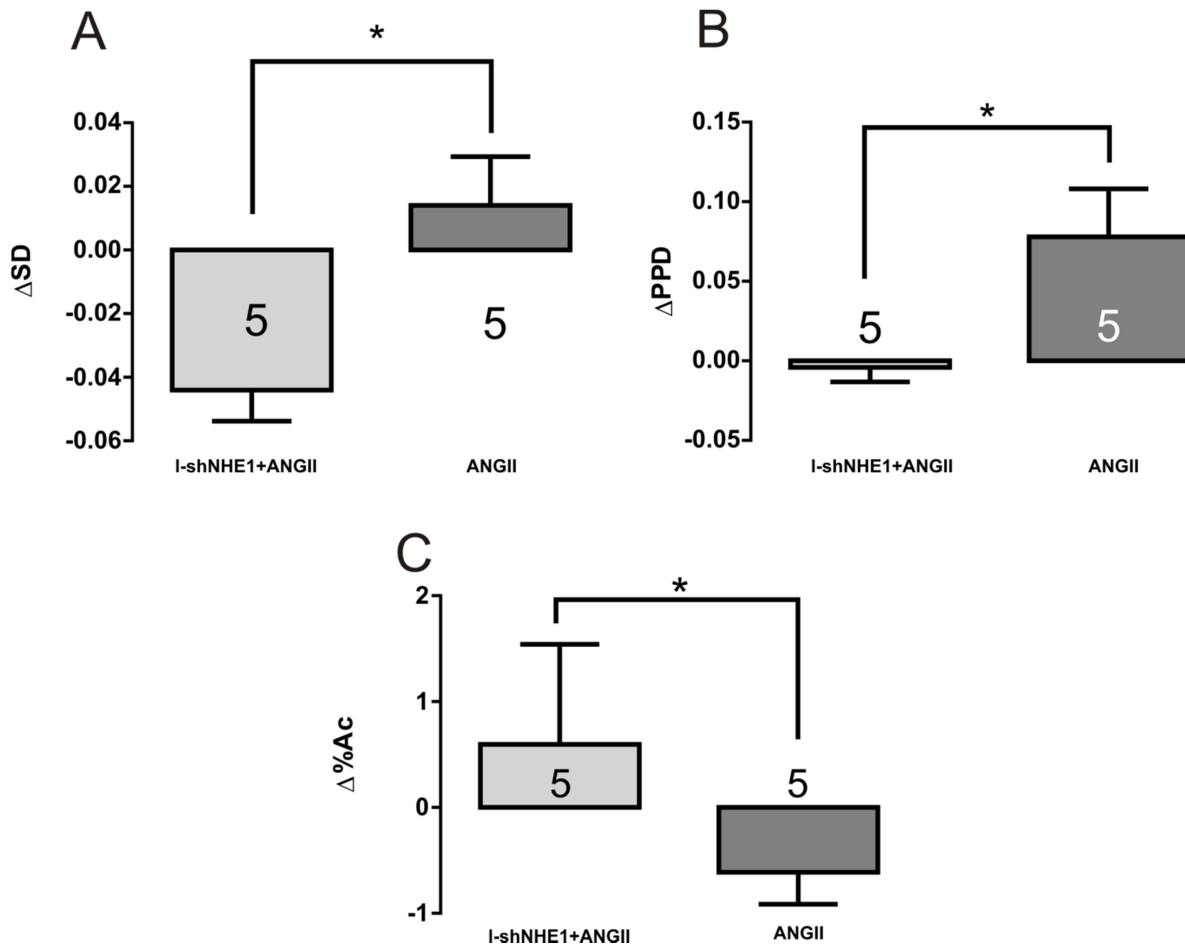


**Figura 26. Parámetro hipertrófico cociente peso corazón sobre longitud de la tibia.** Barras promedio donde se observa que este cociente es menor en los inyectados con I-shNHE1 comparado con ANGII. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\*indica  $p<0,05$ , análisis ANOVA de una vía, Ctrl vs ANGII y I-shNHE1+ANGII vs ANGII).

Además, en los grupos que estuvieron expuestos a la administración crónica de ANGII se evaluó la masa y función cardíacas por ecocardiografía. El silenciamiento parcial del NHE-1 miocárdico fue capaz de disminuir significativamente el desarrollo de HC patológica y al mismo tiempo mejorar la función contráctil respecto al grupo con ANGII pero no inoculado con el I-shNHE1. La administración de ANGII produjo un aumento significativo en los parámetros espesor del septum en diástole ( $\Delta$ SD) y espesor de la pared posterior en diástole ( $\Delta$ PPD) con respecto al grupo I-shNHE1+ANGII (**Figura 27**). También se evaluó por ecocardiografía la función cardíaca, donde se detectó un aumento significativo de la fracción de acortamiento al finalizar el protocolo experimental en el grupo de ratas que recibió la inyección intramiocárdica del I-shNHE1 además de la infusión subcutánea continua de ANGII. Este resultado indica una mejora en la función cardíaca

contráctil como consecuencia del silenciamiento miocárdico del NHE-1 en las ratas crónicamente expuestas a ANGII.

*De estos resultados se puede concluir que el silenciamiento del intercambiador NHE-1 impide el aumento del espesor del SD y PPD producidos durante el desarrollo de HCP inducida por ANGII. El impedir o reducir el desarrollo de HC patológica también mejora la función cardíaca, probablemente por evitar la re expresión de isoformas fetales menos eficientes de las proteínas contráctiles y la acumulación de colágeno intersticial.*

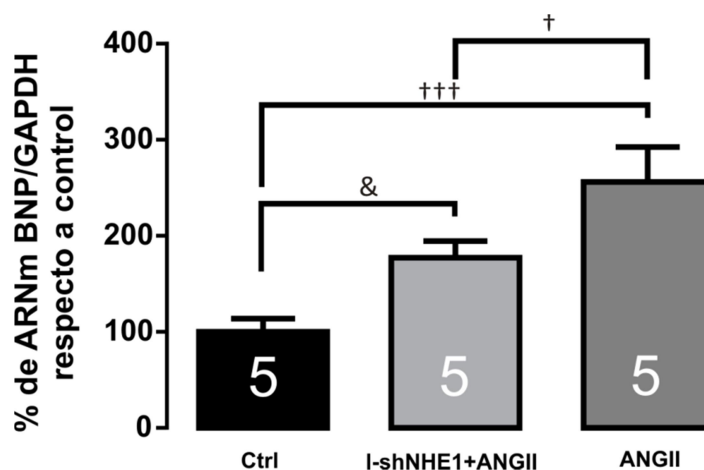


**Figura 27. Parámetros ecocardiográficos diferencias entre antes y después del tratamiento. A.** Espesor del septum en diástole (SD). **B.** Espesor de la pared posterior en diástole (PPD). **C.** Estimación de la función cardíaca a partir de la fracción de acortamiento miocárdico. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\*Indica  $p < 0,05$ , t-test; I-shNHE1+ANGII vs ANGII)



### Expresión de BNP y análisis histológicos

Dado que es ampliamente conocido que la HC provocada por la ANGII es del tipo patológico, fuimos a evaluar la expresión miocárdica del péptido natriurético cerebral (BNP), un marcador molecular reconocido de HC patológica. Por la técnica de PCR en tiempo real observamos que los niveles de ARNm de BNP fueron diferentes en los tres grupos experimentales. En las ratas tratadas con I-shNHE1+ANGII, la expresión de BNP fue significativamente menor que en el grupo ANGII, mientras que en ambos grupos fue mayor a la detectada en el grupo Ctrl (**Figura 28**).

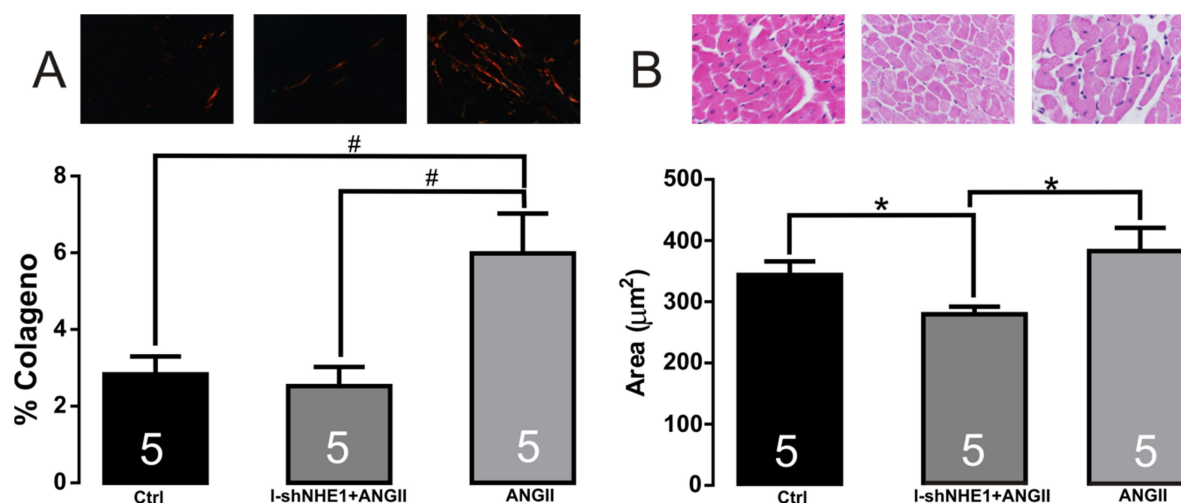


**Figura 28.** Niveles de expresión de ARNm de BNP normalizados con la expresión ARNm que codifica para GAPDH. Las barras representan la media  $\pm$  ES, el número de animales analizados para cada grupo aparecen dentro de las barras. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (& indica  $p<0,05$ , Ctrl vs I-shNHE1+ANGII; † indica  $p<0,05$ , I-shNHE1+ANGII vs ANGII ††† indica  $p<0.001$ , Ctrl vs ANGII, análisis ANOVA de una vía)

Dado que durante la HC patológica hay aumento en la masa cardíaca y en consecuencia del tamaño de los cardiomiocitos y aumento en la fibrosis, estudiamos mediante técnicas histológicas el tamaño celular y el porcentaje de colágeno intersticial. En cuanto al tamaño celular, se evaluó el área de sección transversal de los cardiomiocitos. Encontramos una disminución en este parámetro en las ratas expuestas al I-shNHE1 comparadas con los grupos Ctrl y ANGII (**Figura 29A**). Si bien no observamos

cambios significativos en el área de sección transversal de los cardiomiocitos entre los grupos Ctrl y ANGII, puede que haya un aumento longitudinal de los mismos debido a la adición de sarcómeros en serie en lugar de ser en paralelo. Por otro lado, el porcentaje de colágeno intersticial presentó una disminución significativa en este mismo grupo respecto al grupo ANGII, y ausencia de diferencias con el grupo Ctrl (**Figura 29B**).

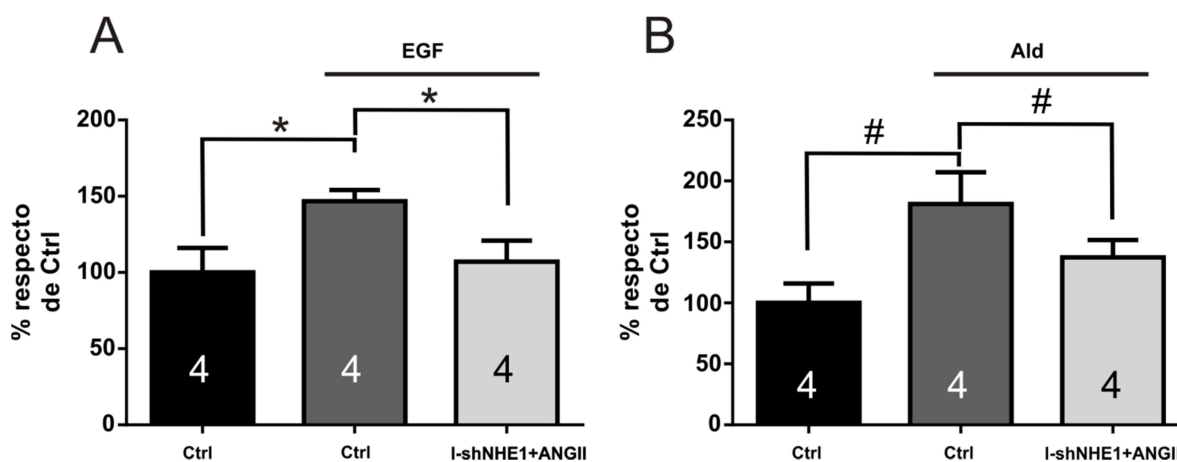
*A partir de los datos observados hasta aquí, se puede concluir que el silenciamiento del NHE-1 prevendría el desarrollo de HC patológica ya que el cociente peso biventricular/longitud de la tibia, los niveles de BNP, el área transversal de los cardiomiocitos y la fibrosis fueron significativamente menores en el grupo tratado con l-shNHE1 comparado con el grupo ANGII.*



**Figura 29. Análisis histológico de corazón.** La administración crónica de ANGII produjo incremento en el porcentaje de colágeno intersticial, lo que fue prevenido por l-shNHE1. En cuanto al área de sección transversal de los cardiomiocitos se observó una disminución en las ratas expuestas al l-shNHE1 comparadas los grupos Ctrl y ANGII. Valores promedio de cada grupo del % colágeno (**A**) y área de sección transversal de los miocitos (**B**); fotos de microscopía representativas (40X). Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\*Indica p<0,05 l-shNHE1+ANGII vs Ctrl y l-shNHE1+ANGII vs ANGII; # indica p<0,05, Ctrl vs ANGII, l-shNHE1+ANGII vs ANGII; análisis ANOVA de una vía).

### Evaluación de estrés oxidativo

En trabajos previos ha sido descripto que el incremento en la actividad del NHE-1 en el miocardio evidenciado durante la HC patológica es dependiente de la formación de EROs[79]. Además, también es conocida la relación entre la hiperactividad del intercambiador y el estímulo para la producción de EROs.



**Figura 30. Producción de anión superóxido por Aldosterona (Ald) y EGF.** Tiras de VI de ambos grupos estimulas Ald (10 nmol/L) y con EGF (0,1 µg/mL). Resultados expresados como porcentaje del control no estimulado. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. (\*indica  $p < 0,05$ , Ctrl vs Ctrl (EGF) y I-shNHE1+ANGII vs Ctrl(EGF); # indica  $p < 0,05$ , Ctrl vs Ctrl (Ald) y I-shNHE1+ANGII vs Ctrl(Ald); análisis ANOVA de una vía).

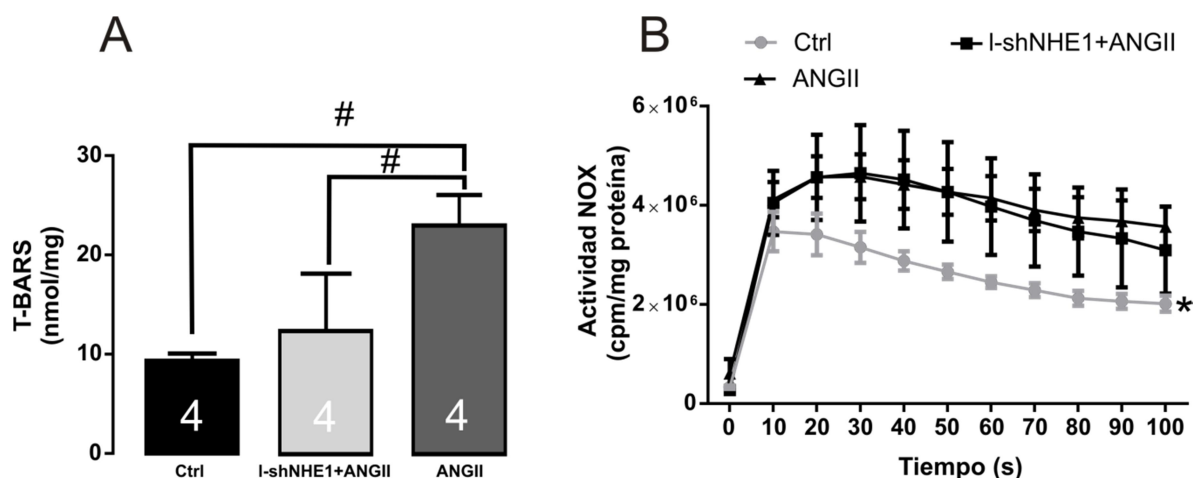
A modo de corroborar las consecuencias del silenciamiento del NHE-1 en el miocardio sobre el estrés oxidativo, realizamos experimentos en tiras delgadas de miocardio ventricular izquierdo de animales de los distintos grupos experimentales en las que la producción de anión superóxido fue estimulada por otros agentes conocidos como inductores de la misma: EGF y aldosterona.

En la **Figura 30** se observa que el grupo tratado con I-shNHE1 presentó una menor producción de anión superóxido ya sea cuando la vía de señalización era estimulada por el EGF como por aldosterona. Es decir, el silenciamiento parcial del NHE-1 miocárdico indujo una disminución del estrés oxidativo, como fue antes reportado en trabajos de nuestro

laboratorio utilizando inhibidores farmacológicos específicos del NHE-1, como el cariporide [80].

A fin de corroborar las diferencias encontradas en la estimulación aguda de la producción de especies reactivas del oxígeno y teniendo en cuenta que el tratamiento con el lentivirus en este proyecto es de tipo crónico, se evaluó el efecto del mismo sobre la peroxidación lipídica en el miocardio. Para ello se cuantificó TBARS en el miocardio ventricular de los distintos grupos experimentales. Se detectaron diferencias significativas en este parámetro entre el grupo l-shNHE1+ANGII y el grupo ANGII, indicando un menor estrés oxidativo cuando el NHE-1 se encontraba menos expresado y con menor actividad **Figura 31A**.

Por otro lado, la NADPH oxidasa, una de las fuentes de producción de  $O_2^-$  más importantes del corazón, puede activarse y modificar su expresión por estimulación con ANGII. En este trabajo se midió su actividad en los tres grupos experimentales, observando un aumento de la misma en los grupos donde se administró ANGII (**Figura 31B**). Esto era de esperarse ya que, como se mencionó anteriormente, la ANGII es un estímulo ampliamente reconocido para su actividad [81].



**Figura 31. Estado redox basal en los grupos tratados.** **A.** Medición de la peroxidación lipídica en homogenatos de VI mediante la técnica de TBARS. Dentro de las barras se muestra el número de animales de experimentación. **B.** Actividad basal de NOX medida por el método de lucigenina. La administración del I-shNHE1 no modificó el aumento producido por ANGII en la actividad de NOX. Número de animales de experimentación utilizados para cada grupo: Ctrl (3), I-shNHE1+ANGII (5), ANGII (5). (#Indica  $p < 0,05$ , Ctrl vs ANGII y I-shNHE1+ANGII vs ANGII; \* indica  $p < 0,05$ , Ctrl vs I-shNHE+ ANGII y Ctrl vs ANGII; análisis ANOVA de una vía).

A partir de estos resultados podemos decir que el silenciamiento parcial del NHE-1 es capaz de disminuir la producción de EROs constatada por la disminución de la peroxidación lipídica y también de la producción de superóxido cuando se estimulan intermediarios de la vía de señalización de ANGII. Sin embargo, el silenciamiento del NHE-1 no parece ser capaz de evitar la estimulación de la NOX por la ANGII.

# DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, el uso de inhibidores farmacológicos específicos del NHE-1 en ensayos preclínicos de HC patológica y de daño miocárdico por isquemia/reperfusión ha dado resultados beneficiosos. Específicamente en cuanto a la HC patológica, fue demostrado en numerosos modelos experimentales que la inhibición farmacológica específica del NHE-1 es capaz de prevenir o inducir la regresión del aumento de la masa miocárdica. El conjunto de estos resultados dio el sustento para investigar estos fármacos en el área clínica y se diseñaron distintos ensayos con tal propósito [64-66]. Desafortunadamente, los resultados obtenidos a partir de estos estudios no fueron los esperados. Sólo en el EXPEDITION y en un subgrupo de pacientes incluidos en el GUARDIAN se reportaron beneficios del tratamiento con cariporide [65, 66]. Por el contrario, pusieron de manifiesto potenciales efectos delétereos, quizás atribuibles a la dosis y vía de administración empleadas de estos fármacos. En este sentido, el estudio EXPEDITION debió ser suspendido en forma prematura debido al aumento de la incidencia de eventos cerebrovasculares y mortalidad atribuida a los mismos en el grupo de pacientes tratados con la droga [66]. Si bien no ha sido esclarecido aun el motivo de estos efectos adversos, las causas podrían derivar de la inhibición sistémica del intercambiador (y no sólo restringida al miocardio) y eventualmente de la presencia de efectos inespecíficos de los fármacos usados. Otra desventaja de los fármacos administrados podría ser que estuviesen no solo evitando la hiperactividad del intercambiador a nivel miocárdico sino también interfiriendo con la actividad basal y necesaria para la homeostasis en los distintos tejidos. Además, este tipo de inhibidores, si bien tienen mayor afinidad por la isoforma NHE-1, no dejan de interferir, en menor grado, con otras isoformas del NHE-1, restándole especificidad a su efecto e incrementando la posibilidad de producir efectos indeseados.

Conociendo los antecedentes clínicos, sumado al advenimiento de nuevas técnicas de silenciamiento génico a partir del uso de ARN de interferencia [82], se consideró que la administración por inyección intramiocárdica directa de un lentivirus portador de una secuencia de ARNi contra en NHE-1 podía resultar una estrategia adecuada para lograr la inhibición miocárdica específica del NHE-1. Cabe recordar que los ARNi permiten disminuir

o cancelar la expresión de un gen específico sin influir sobre la expresión de otras proteínas, incluso si éstas poseen un alto grado de homología. Esta estrategia debería proveer los beneficios de la inhibición farmacológica, dejando de lado los efectos indeseados del inhibidor sobre otras isoformas y órganos. Por otro lado, esta técnica permite que el silenciamiento génico perdure al menos un mes [72, 83]. En relación con lo anterior, en trabajos previos de nuestro laboratorio se utilizó la secuencia de ARNi contra el NHE-1 (shNHE1), ya sea desnuda [84] o ensamblada en el genoma de un lentivirus [70, 83] y se logró tanto silenciar la expresión como disminuir la actividad del NHE-1 en corazones de ratas normotensas y en corazones hipertróficos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). En estos estudios se observó que el silenciamiento ocurrió específicamente en el corazón y que se extendió sobre todo el ventrículo izquierdo, en lugares distantes al sitio de inyección, pero no en tejidos extracardíacos, en concordancia con lo publicado por otros autores [72, 85, 86]. Asimismo, en un trabajo donde se utilizó esta metodología se demostró que la inyección intramiocárdica de l-shNHE-1 es capaz de reducir la masa ventricular izquierda en ratas SHR adultas [83].

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el uso de vectores virales clínicamente no escapa a ciertos problemas de seguridad y éticos que todavía quedan por resolver. Por lo tanto, antes de proponer su uso masivo en la clínica deberán resolverse los aspectos vinculados a la bioseguridad. Será necesario considerar la posibilidad de la generación de virus competentes para la replicación que pueden generarse durante la producción de vectores así como la posibilidad de generación de mutaciones por inserción que puedan llevar al desarrollo de cáncer, entre otros inconvenientes[87, 88].

La ANGII es un octapéptido capaz de incrementar la presión sanguínea e inducir el desarrollo de HC [89]. Es más, ha sido demostrado que esta hormona mediante la unión a su receptor AT1 estimula la actividad del NHE-1 [90]. Entre las vías de señalización intracelulares activadas por ANGII, se ha propuesto que la estimulación de la NADPH oxidasa juega un rol clave en la señalización que conduce al desarrollo de HC patológica [91]. Previamente hemos demostrado que pequeñas cantidades de EROs producidos por la NADPH oxidasa inducen la liberación de cantidades mucho mayores de EROs por las



mitocondrias, proceso conocido como liberación de EROs inducidos por EROs (“ROS induced ROS release”) [80]. Estas EROs activan quinasas redox sensibles que participan en la vía de activación por fosforilación del dominio regulatorio del NHE-1, lo que conduce a la hiperactivación del intercambiador.

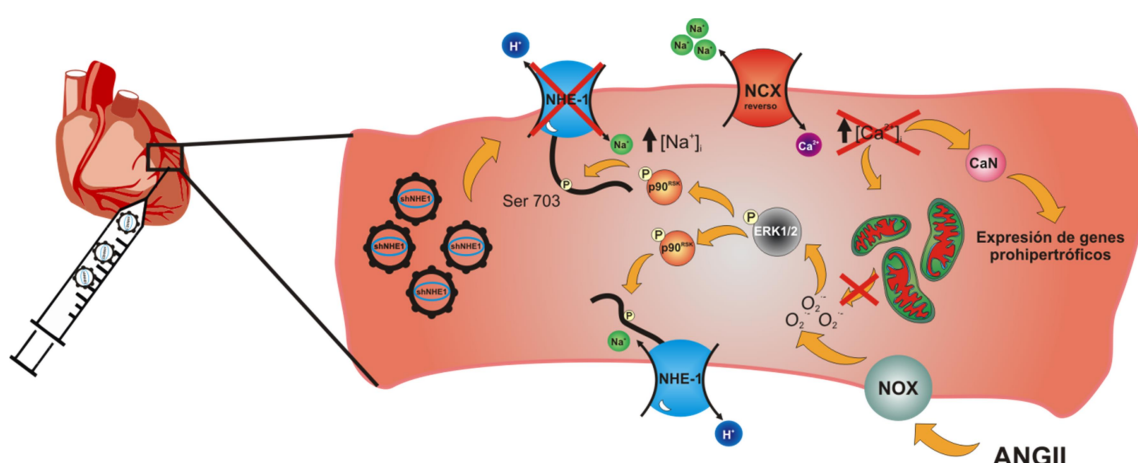
Una de las consecuencias de la activación del NHE-1 es el aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  que a su vez favorece la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula a través del funcionamiento en modo reverso del intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX)[92]. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular favorece la activación de la fosfatasa calcineurina y la transcripción de genes prohipertróficos [93, 94]. Particularmente, se ha descrito en diferentes trabajos el efecto inotrópico negativo de la calcineurina a través de diferentes mecanismos [95, 96].

Por lo tanto, la disminución de la expresión del NHE-1 por la administración intramiocárdica de l-shNHE1 emerge como una estrategia adecuada para prevenir la sobrecarga intracelular de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de la vía de calcineurina y el desarrollo de HC patológica con una actividad contráctil cardíaca disminuida. La preservación de la función contráctil luego de la regresión de la HC no parece ser exclusiva de la regresión inducida mediante la inhibición del NHE-1[97]. Parece que en el miocardio, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se encuentra compartamentalizado de manera tal que existen reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  que participan durante la contracción y otros donde el  $\text{Ca}^{2+}$  regula vías de señalización. En concordancia con esto, se ha sugerido que la calcineurina es activada preferentemente por el incremento de los niveles diastólicos de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  [98, 99]. Por lo tanto, se podría especular que la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico puede ser censada por la vía de  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina-calcineurina, pero no por la maquinaria contráctil.

Es interesante recalcar que la administración del l-shNHE1 no normalizó los valores la presión sistólica ni la actividad de la NADPH oxidasa, pero en cambio sí lo hizo con los niveles de peroxidación lipídica. Es decir, una menor actividad del NHE-1 reduce el estrés oxidativo derivado de la producción mitocondrial de EROs, posiblemente por evitar la sobrecarga de calcio. Estos resultados concuerdan con reportes previos de nuestro

laboratorio que indican que la inhibición farmacológica específica del NHE-1 previene el estrés oxidativo [80]. Además, el evitar el estrés oxidativo impediría una mayor actividad aun del NHE-1 que podría esperarse por activación de las quinasas sensibles a EROs capaces de fosforilar al NHE-1 en el residuo serina 703.

En la siguiente figura se describe la vía de señalización propuesta como consecuencia de disminuir la expresión del NHE-1 en un modelo experimental de HC patológica inducida por ANGII.



**Figura 32. Mecanismo de señalización propuesto como consecuencia del silenciamiento miocárdico del NHE-1 en ratas con infusión de ANGII.** La reducción de la expresión de NHE-1 mediante el uso de ARNi no disminuye la producción de EROs por la NADPH oxidasa estimulada con ANGII, pero previene el estrés oxidativo producto de los EROs mitocondriales. A su vez esto evitaría una estimulación mayor del NHE-1 por quinasas redox-sensibles.

**Limitaciones del trabajo:**

Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral surgieron ciertos inconvenientes con respecto al financiamiento para la adquisición de insumos. A fin de optimizar los recursos económicos, y basándonos en los resultados de experimentos in vitro y de experimentos preliminares in vivo comparando la inyección intramiocárdica del I-shSCR con la de PBS sin observar diferencias significativas entre los dos grupos, se decidió utilizar como grupo control negativo animales inyectados con PBS en lugar de I-shSCR, a diferencia de los ensayos realizados in vitro. Si bien al momento actual no podemos descartar completamente efectos derivados de la inyección del lentivirus independientemente del silenciamiento del NHE-1; en trabajos previos de nuestro laboratorio donde se ha utilizado I-shSCR como control negativo, no se observaron efectos que puedan llegar a repercutir en los parámetros analizados debido a alguna respuesta al lentivirus. [72, 83] Otro aspecto que merece ser considerado se refiere al porcentaje de silenciamiento del NHE-1 obtenido, tanto en los ensayos in vitro como in vivo. Si bien es deseable que el grado de silenciamiento al utilizar un shRNA sea mayor al observado en ambos modelos, resultados muy similares a los presentes en este trabajo han sido obtenidos por otros investigadores además de nuestro grupo en oportunidades previas [83, 85, 100, 101].

# CONCLUSIONES

Las conclusiones principales del presente trabajo son las siguientes:

1. Se desarrolló un lentivirus de tercera generación portador de una secuencia de shRNA capaz de silenciar de manera específica al NHE-1 en los modelos *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, a partir del silenciamiento se logró disminuir su funcionalidad en un modelo *in vitro*.
2. El silenciamiento parcial del NHE-1 previene el desarrollo de HC patológica y mejora la función contráctil en ratas Wistar sometidas a administración crónica de ANGII. Esto se verificó a partir de la medida tanto de parámetros morfométricos como ecocardiográficos en los animales inyectados con l-shNHE1.
3. A nivel histológico, el efecto de la disminución de la expresión del NHE-1 condujo a una menor área de los cardiomiocitos y a un impedimento en el desarrollo de fibrosis.
4. El estrés oxidativo generado por la administración de ANGII disminuyó en el miocardio de las ratas con menor expresión del NHE-1.

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, concluimos que el silenciamiento específico del NHE-1 a través del método de ARNi administrado de forma local, es una posible estrategia terapéutica para la prevención de la HC patológica desarrollada por sobrecarga hemodinámica.

# REFERENCIAS

## Referencias

1. Nag, A.C., *Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution*. Cytobios, 1980. **28**(109): p. 41-61.
2. Casale, P.N., et al., *Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men*. Ann Intern Med, 1986. **105**(2): p. 173-8.
3. Brown, D.W., W.H. Giles, and J.B. Croft, *Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension*. Am Heart J, 2000. **140**(6): p. 848-56.
4. Mathew, J., et al., *Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1615-21.
5. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
6. Schillaci, G., et al., *Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension*. Hypertension, 2000. **35**(2): p. 580-6.
7. McKinsey, T.A. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(3): p. 267-74.
8. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 551-71.
9. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. Cell, 1999. **98**(5): p. 555-8.
10. MacLellan, W.R. and M.D. Schneider, *Success in failure: modeling cardiac decompensation in transgenic mice*. Circulation, 1998. **97**(15): p. 1433-5.
11. Hunter, J.J. and K.R. Chien, *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. N Engl J Med, 1999. **341**(17): p. 1276-83.
12. van Empel, V.P. and L.J. De Windt, *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 487-99.
13. Verdecchia, P., et al., *Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension*. Circulation, 1998. **97**(1): p. 48-54.
14. Chien, K.R., et al., *Transcriptional regulation during cardiac growth and development*. Annu Rev Physiol, 1993. **55**: p. 77-95.
15. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. Circulation, 2000. **102**(4): p. 470-9.
16. Frohlich, E.D., et al., *The heart in hypertension*. N Engl J Med, 1992. **327**(14): p. 998-1008.
17. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
18. Wakabayashi, S., et al., *A novel topology model of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7942-9.
19. Denker, S.P., et al., *Direct binding of the Na<sup>+</sup>-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H<sup>+</sup> translocation*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1425-36.
20. Nygaard, E.B., et al., *Structural modeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1, NHE1*. J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 634-48.
21. Landau, M., et al., *Model structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37854-63.
22. Cox, G.A., et al., *Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice*. Cell, 1997. **91**(1): p. 139-48.

## Referencias

23. Numata, M., et al., *Identification of a mitochondrial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6951-9.
24. Lin, X. and D.L. Barber, *A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12631-6.
25. Bertrand, B., et al., *The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13703-9.
26. Lehoux, S., et al., *14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15794-800.
27. Li, X., et al., *Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36085-91.
28. Yan, W., et al., *The Nck-interacting kinase (NIK) phosphorylates the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger NHE1 and regulates NHE1 activation by platelet-derived growth factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31349-56.
29. Xue, J., et al., *Novel functional interaction between Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 and tyrosine phosphatase SHP-2*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(6): p. R2406-16.
30. Simonin, A. and D. Fuster, *Nedd4-1 and beta-arrestin-1 are key regulators of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 ubiquitylation, endocytosis, and function*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38293-303.
31. Jung, Y.S., et al., *Physical interactions and functional coupling between Daxx and sodium hydrogen exchanger 1 in ischemic cell death*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1018-25.
32. Karki, P., et al., *B-Raf associates with and activates the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13096-105.
33. Takahashi, E., et al., *p90(RSK) is a serum-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20206-14.
34. Meima, M.E., et al., *The sodium-hydrogen exchanger NHE1 is an Akt substrate necessary for actin filament reorganization by growth factors*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26666-75.
35. Snabaitis, A.K., F. Cuello, and M. Avkiran, *Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 881-90.
36. Khaled, A.R., et al., *Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7545-57.
37. Malo, M.E., L. Li, and L. Fliegel, *Mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger is mediated through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6292-9.
38. Coccaro, E., et al., *Phenylephrine and sustained acidosis activate the neonatal rat cardiomyocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(2): p. H846-58.
39. Karki, P., E. Coccaro, and L. Fliegel, *Sustained intracellular acidosis activates the myocardial Na(+)/H(+) exchanger independent of amino acid Ser(703) and p90(rsk)*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(8): p. 1565-76.
40. Cingolani, H.E. and I.L. Ennis, *Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1090-100.
41. Alvarez, M.C., et al., *Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress?* Hypertens Res, 2008. **31**(7): p. 1465-76.



## Referencias

42. Moor, A.N. and L. Fliegel, *Protein kinase-mediated regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22985-92.
43. Moor, A.N., et al., *Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16113-22.
44. Cuello, F., et al., *Evidence for direct regulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 phosphorylation and activity by 90-kDa ribosomal S6 kinase (RSK): effects of the novel and specific RSK inhibitor fmk on responses to alpha1-adrenergic stimulation*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(3): p. 799-806.
45. Camilion de Hurtado, M.C., et al., *Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 862-8.
46. Garcarena, C.D., et al., *Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart*. J Appl Physiol, 2009. **106**(4): p. 1325-31.
47. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
48. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
49. Santos, R.A., A.J. Ferreira, and E.S.A.C. Simoes, *Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis*. Exp Physiol, 2008. **93**(5): p. 519-27.
50. Jankowski, V., et al., *Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 297-302.
51. Yang, R., et al., *Pressor and renal hemodynamic effects of the novel angiotensin A peptide are angiotensin II type 1A receptor dependent*. Hypertension, 2011. **57**(5): p. 956-64.
52. Lautner, R.Q., et al., *Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system*. Circ Res, 2013. **112**(8): p. 1104-11.
53. Qaradakh, T., et al., *Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms*. Cardiovasc Ther, 2017. **35**(6).
54. Liu, C., et al., *Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats*. Amino Acids, 2018.
55. Santos, R.A.S., et al., *The Renin-Angiotensin System: Going Beyond the Classical Paradigms*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019.
56. Xiao, L., et al., *Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(4): p. C926-34.
57. Nakamura, K., et al., *Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II*. Circulation, 1998. **98**(8): p. 794-9.
58. Hirotani, S., et al., *Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy*. Circulation, 2002. **105**(4): p. 509-15.
59. Li, J.M., et al., *Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 477-84.
60. Cingolani, H.E., et al., *Role of autocrine/paracrine mechanisms in response to myocardial strain*. Pflugers Arch, 2011. **462**(1): p. 29-38.
61. Aiello, E.A., et al., *Endothelin-1 stimulates the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger reverse mode through intracellular Na<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>i)-dependent and Na<sup>+</sup>i-independent pathways*. Hypertension, 2005. **45**(2): p. 288-93.

## Referencias

62. Takewaki, S., et al., *Activation of Na(+)-H+ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 729-42.
63. Cingolani, H.E., et al., *Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 373-7.
64. Zeymer, U., et al., *The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(6): p. 1644-50.
65. Theroux, P., et al., *Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators*. Circulation, 2000. **102**(25): p. 3032-8.
66. Mentzer, R.M., Jr., et al., *Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study*. Ann Thorac Surg, 2008. **85**(4): p. 1261-70.
67. Tiscornia, G., O. Singer, and I. Verma, *Development of lentiviral vectors expressing siRNA in Gene Transfer - Delivery and expression of DNA and RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007: p. 23-34.
68. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
69. Zennou, V., et al., *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell, 2000. **101**(2): p. 173-85.
70. Perez, N.G., et al., *Silencing of NHE-1 blunts the slow force response to myocardial stretch*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(3): p. 874-80.
71. Jordan, M. and F. Wurm, *Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate*. Methods, 2004. **33**(2): p. 136-43.
72. Diaz, R.G., et al., *Myocardial mineralocorticoid receptor activation by stretching and its functional consequences*. Hypertension, 2014. **63**(1): p. 112-8.
73. Barth, A.S., et al., *Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na+-Ca2+ exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells*. Mol Ther, 2008. **16**(5): p. 957-64.
74. Lang, R.M., et al., *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology*. J Am Soc Echocardiogr, 2005. **18**(12): p. 1440-63.
75. Bunag, R.D., *Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure*. J Appl Physiol, 1973. **34**(2): p. 279-82.
76. Yarana, C., et al., *Calcium-induced cardiac mitochondrial dysfunction is predominantly mediated by cyclosporine A-dependent mitochondrial permeability transition pore*. Arch Med Res, 2012. **43**(5): p. 333-8.
77. Odunewu, A. and L. Fliegel, *Acidosis-mediated regulation of the NHE1 isoform of the Na(+)/H(+) exchanger in renal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(3): p. F370-81.
78. Villa-Abrille, M.C., et al., *Silencing of cardiac mitochondrial NHE1 prevents mitochondrial permeability transition pore opening*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1237-51.

## Referencias

79. Cingolani, O.H., et al., *In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy*. Pflugers Arch, 2011. **462**(5): p. 733-43.
80. Garcarena, C.D., et al., *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action*. J Appl Physiol, 2008. **105**(6): p. 1706-13.
81. Byrne, J.A., et al., *Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. 802-5.
82. Solomon, S.D., et al., *Changes in ventricular size and function in patients treated with valsartan, captopril, or both after myocardial infarction*. Circulation, 2005. **111**(25): p. 3411-9.
83. Nolly, M.B., et al., *Cardiac hypertrophy reduction in SHR by specific silencing of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. J Appl Physiol (1985), 2015. **118**(9): p. 1154-60.
84. Morgan, P.E., et al., *Silencing of sodium/hydrogen exchanger in the heart by direct injection of naked siRNA*. J Appl Physiol, 2011. **111**(2): p. 566-72.
85. Schuman, M.L., et al., *Cardiac thyrotropin-releasing hormone mediates left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2011. **57**(1): p. 103-9.
86. Kizana, E., E. Cingolani, and E. Marban, *Non-cell-autonomous effects of vector-expressed regulatory RNAs in mammalian heart cells*. Gene Ther, 2009. **16**(9): p. 1163-8.
87. Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay, *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(5): p. 346-58.
88. Connolly, J.B., *Lentiviruses in gene therapy clinical research*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1730-4.
89. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
90. Matsui, H., et al., *Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(2): p. 215-21.
91. Garrido, A.M. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 148-58.
92. Veitenhansl, M., et al., *40(th) EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Munich, Germany, 5-9 September 2004*. Diabetologia, 2004. **47**(Suppl 1): p. A1-A464.
93. Hisamitsu, T., T.Y. Nakamura, and S. Wakabayashi, *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 directly binds to calcineurin A and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(16): p. 3265-80.
94. Ennis, I.L., et al., *Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 (NHE-1) inhibition*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(3-4): p. 301-10.
95. Sah, R., et al., *Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice*. Circulation, 2002. **105**(15): p. 1850-6.
96. Li, J., et al., *Neurally-mediated increase in calcineurin activity regulates cardiac contractile function in absence of hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(3): p. 649-57.
97. Esposito, G., et al., *Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 85-92.
98. Frey, N., et al., *Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1336-43.

## Referencias

99. Wu, X., et al., *Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 675-82.
100. Brea, M.S., et al., *Epidermal Growth Factor Receptor Silencing Blunts the Slow Force Response to Myocardial Stretch*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(10).
101. Liu, Q., *Lentivirus mediated interference of Caspase-3 expression ameliorates the heart function on rats with acute myocardial infarction*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(13): p. 1852-8.